

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RELATIONS ENTRE LA DYNAMIQUE DES COMMUNAUTÉS DE CYANOBACTÉRIES ET
LA TOXICITÉ DE L'EAU DANS LE BASSIN VERSANT DE LA RIVIÈRE YAMASKA

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR
ALEXANDRE GUINDON

MAI 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Toute ma reconnaissance à Kathleen Leclerc, Gabriela Heleno, Pierre Marcoux, Jennifer Boisvert, Maude Roberge et Guy Vermette pour leur aide précieuse sur le terrain. Merci particulier à Mark McCarthy qui, en plus de participer aux sorties, m'a soutenu dans toutes les étapes d'analyse de données et de rédaction. Je n'oublie pas Catherine Beauchemin, Serge Paquet et Brahim Sabour et Hongmei Jing pour leur travail et leurs conseils techniques.

Je remercie également tous les professeurs du GRIL, particulièrement messieurs del Giorgio, Peres-Neto et Prairie pour leurs précieux conseils conceptuels et statistiques. Du même souffle, j'aimerais remercier mon directeur, David Bird, pour sa disponibilité et sa créativité, de même qu'Alessandra Giani, dont le regard ouvert et constructif sur mes travaux a été fort apprécié.

Je tiens à souligner le travail de nos collaborateurs au Conseil National de Recherche du Canada, Nathalie Fortin et Charles Greer, ainsi que Rocio Aranda-Rodriguez de Santé Canada.

Finalement, mes collègues, Ariane Cantin, Jérôme Comte, Sonya Lévesque, Maria José Maezo et Richard Vogt pour leur soutien et leur intérêt lors de nos nombreux et fructueux échanges.

AVANT-PROPOS

Le présent mémoire est divisé en quatre chapitres. Les deux premiers sont rédigés en français et placent le travail dans son contexte actuel. Tout d'abord, l'introduction est une revue de la littérature scientifique pertinente. Le second chapitre décrit en détail les procédures moléculaires utilisées. Ces méthodes évoluent très vite, et les contraintes d'espace des articles scientifiques ne permettent pas d'entrer dans le détail des nombreux choix effectués. De plus, une analyse phylogénétique, servant à valider la méthode et à mieux interpréter les résultats, est comprise dans ce chapitre mais pas dans l'article. Ce dernier, inséré au chapitre trois, est rédigé en anglais et s'intitule : Temperature related dynamics of toxic cyanobacterials communities in the Yamaska river basin. Finalement, le quatrième chapitre est une conclusion générale en français.

La contribution des différents auteurs à l'article ci-haut mentionné est la suivante :

1. Alexandre Guindon : rédaction, expérimentation (taxonomie, nutriments, analyses génétiques), figures, recherche bibliographique, travail de terrain, analyse des données.
2. Rocio Aranda-Rodriguez : dosage des microcystines
3. Nathalie Fortin : design de l'amorce CYA-MIC
4. Hongmei Jing : soutien technique pour les manipulations génétiques
5. David Bird : directeur de recherche

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	iii
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX	viii
RÉSUMÉ	ix
CHAPITRE I	
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
Toxines.....	2
Quelques genres toxinogènes.....	6
Variations intra-spécifiques.....	10
Objectifs	12
CHAPITRE II	
VALIDATION DES OUTILS MOLÉCULAIRES VISANT LA VISUALISATION DE LA SUCCESSION SAISONNIÈRE DES CYANOBACTÉRIES TOXIQUES.....	14
Introduction.....	14
Méthodologie détaillée.....	17
Extraction de l'ADN	17
PCR et amorces.....	18
Analyses statistiques.....	21
Validation des résultats	24
Répétabilité.....	24
Spécificité.....	26
Conclusion	31

CHAPITRE III	
TEMPERATURE-RELATED DYNAMICS OF TOXIC CYANOBACTERIAL COMMUNITIES IN THE YAMASKA RIVER BASIN	33
ABSTRACT	34
INTRODUCTION	35
MATERIALS AND METHODS	37
Study lakes	37
Sample collection and analysis.....	37
Statistical analyses.....	42
RESULTS.....	43
Description and comparisons of the study lakes.....	43
Dynamics of the molecular and taxonomic indices.....	52
Discussion.....	56
Supplementary material.....	63
CHAPITRE IV	
CONCLUSION GÉNÉRALE	64
BIBLIOGRAPHIE.....	67
ANNEXE I	76

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1	Structure moléculaire de la microcystine-LR..... 3
2.1	Exemple d'un gel d'agarose-EtBr pour vérification des produits d'extraction. Le numéro de l'échantillon est suivi de la lettre du réplicat..... 18
2.2	Exemple d'un gel d'agarose-EtBr pour quantification des produits d'amplification. La voie de gauche est un contrôle négatif pour lequel aucun ADN n'a été ajouté au mélange réactionnel. L'échelle (au centre) est suivie d'échantillons numérotés (à droite)..... 20
2.3	Comparaison entre les indices de similarité obtenus lors de deux analyses distinctes A et B. Chaque point correspond à la similarité entre deux mêmes échantillons (même extraction, amplifications séparées), analysés sur deux gels distincts (A et B). La ligne correspond à la relation 1:1..... 25
2.4	Arbre phylogénétique des séquences obtenues du lac Brome..... 28
2.5	Arbre phylogénétique des séquences obtenues du lac Waterloo..... 29
2.6	Gel DGGE des produits PCR CYA-MIC et identification des bandes séquencées pour le lac Waterloo..... 30

Figure		Page
3.1	Concentration of microcystin and biomass of toxigenic genera over the summer of 2007. Biomasses of species of <i>Microcystis</i> and <i>Planktothrix</i> other than the ones shown (<i>M. aeruginosa</i> and <i>P. agardhii</i>) were negligible in terms of algal biomass. Details of <i>Anabaena</i> species composition are included in the supplementary material. Note the different MC concentrations and phytoplankton biomass scales for each lake.....	47
3.2	Microcystin content, expressed as the fraction of cellular carbon incorporated in microcystin molecules, for each lake and date.....	48
3.3	Partitioning of the variation in MC concentration among molecular and taxonomic descriptors. Circles and squares are scaled to the fraction total variance explained.....	51
3.4	Community dynamics of the samples lakes. a) Seasonal changes in community composition. b) Correlation between 5 day average air temperature and rate of change of the 16S fingerprints. c) Correlation between rate of change and measured MC concentrations d) Offset of 16S and taxonomic rates of change.....	55
3.5	Time series of potentially toxic cyanobacterial species biomass.....	63

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1	Rôles hypothétiques de la microcystine 4
2.1	Programme PCR utilisé pour l'amplification du gène codant pour la sous-unité 16S du ribosome.....19
2.2	Corrélations des décomptes taxonomiques et des données moléculaires..... 26
3.1	Primers used in this study..... 39
3.2	Genera of cyanobacteria amplified by the primers..... 40
3.3	Mean values for morphometric and physicochemical variables of the study lakes over the sampling period in 2007 43
3.4	Correlations with log-transformed total MC ($\mu\text{g L}^{-1}$). Results are adjusted r^2 values, with negative slopes when italicized. ** : $p < 0,01$ * : $p < 0,05$ No star : $p < 0,1$49
3.5	Ratio of surface area to mean depth of the study lakes (km^2/m).....60

RÉSUMÉ

La production de toxines telles que la microcystine (MC) est le principal problème de santé publique relié à la croissance excessive des cyanobactéries dans les lacs eutrophes. La toxicité résultante sera reliée à la dominance de genres potentiellement toxiques au sein de la communauté. Dans le cadre de cette étude, cinq lacs du bassin versant de la rivière Yamaska (Québec) ont été échantillonnés durant l'été 2007. Les cyanobactéries ont été caractérisées sur un gel contenant un gradient de dénaturant (DGGE) à la suite de l'amplification du gène 16S du ribosome. De plus, un dénombrement microscopique classique a été entrepris. Les toxines ont aussi été dosées de deux façons, soit une méthode immuno-enzymatique et une autre basée sur la chromatographie liquide. Les résultats confirment l'association des genres potentiellement toxiques à la concentration de MC, en particulier *Anabaena*. Ces corrélations sont meilleures lorsqu'entreprises à partir des données taxonomiques, avec un r^2 aj. atteignant 0,64 ($p < 0,0001$). Les données DGGE, moins adaptées à la détermination d'un modèle prédictif de MC, expliquent néanmoins une partie de la variation lorsque celle-ci est partitionnée dans une analyse de redondance. De plus, les analyses moléculaires étaient plus sensibles aux changements dans la communauté. La vitesse de changement telle que déterminée par DGGE était corrélée à celle déterminée par la taxonomie sur l'échantillon pris deux semaines plus tard ($n=22$, r^2 adj. = 0,32, $p=0,004$). Ceci pourrait conférer au DGGE une valeur prédictive intéressante puisque la dynamique des communautés a montré une association entre stabilité et toxicité dans deux des cinq lacs. Cette stabilité, exprimée sous forme de taux de changement, est associée aux températures les plus élevées de la saison (r^2 aj. = 0,21 pour le DGGE et 0,28 pour la taxonomie, $p < 0,005$).

MOTS CLÉS : cyanobactéries toxiques, succession saisonnière, Haute-Yamaska, *Microcystis*, DGGE.

CHAPITRE I

INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'accès à de l'eau propre, une ressource prise pour acquise au Québec, est un problème majeur pour de nombreuses communautés. La pollution chimique ou biologique peut sérieusement endommager les écosystèmes aquatiques. Un exemple bien connu est l'eutrophisation des lacs et des rivières, causée surtout par un excès de phosphore dans l'eau (Correll 1998). Depuis quelques années, les cyanobactéries (aussi appelées algues bleues) menacent la santé des lacs et du public au Québec en raison de l'apparition de « blooms » saisonniers dans plusieurs plans d'eau de la province (MDDEP 2008). Les cyanobactéries semblent posséder un fort avantage écologique sur les autres espèces photosynthétiques en présence des conditions de fertilisation anthropique des eaux, et leur communauté s'accroît parfois de façon démesurée (World Health Organization 1999). Apparaîtront alors les fleurs d'eau, agrégats de cellules à l'aspect verdâtre et visqueux (Blais 2002).

Les cyanobactéries sont des procaryotes photoautotrophes cosmopolites en milieu lacustre. Ils possèdent les photosystèmes I et II et utilisent l'eau comme donneur d'électrons pour la réduction du dioxyde de carbone. Elles possèdent de la chlorophylle a, mais aussi des phycobilines (en particulier la phycocyanine), pigments accessoires caractéristiques impliqués dans le transport d'énergie jusqu'au photosystème II (Prescott, Harley et al. 1995).

Une des premières formes de vie sur Terre, les cyanobactéries sont apparues entre 3,5 (Schopf 2006) et 2,6 (Hedges, Chen et al. 2001) milliards d'années, selon que l'on se fie aux fossiles ou aux analyses phylogénétiques. Leur influence sur l'écosystème terrestre est énorme ; on a proposé que l'avènement de la photosynthèse chez ces organismes a oxydé l'atmosphère terrestre (Kump 2008).

Toxines

Certaines espèces de cyanobactéries produisent des toxines, généralement classées en trois catégories : dermatoxines, neurotoxines et hépatotoxines (Carmichael 1994). La première catégorie attaque la peau et cause des dermatites, pouvant aller jusqu'à de sévères inflammations, une atteinte aux muqueuses nasales et oculaires, ou des troubles digestifs en cas d'ingestion (Carmichael 1994). Les neurotoxines incluent les anatoxines et saxitoxines, qui peuvent entraîner la paralysie et la stimulation des cellules musculaires, respectivement. Ces mécanismes ont tous deux pour conséquence ultime l'arrêt des fonctions respiratoires. Finalement, les hépatotoxines regroupent les microcystines, nodularines et cylindrospermopsines. Du nombre, la microcystine (MC) est celle qui est la plus étudiée, et pour laquelle les méthodes d'analyses sont les plus avancées.

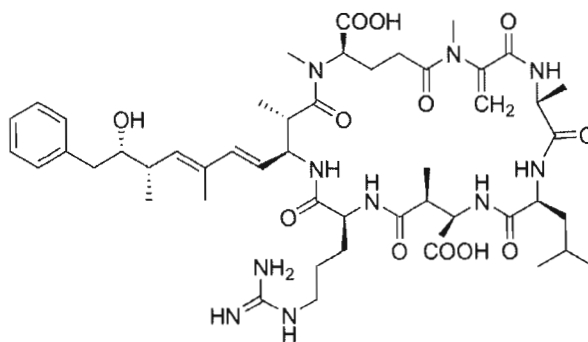


Figure 1.1 Structure moléculaire de la microcystine-LR

Plusieurs cas d'empoisonnement d'animaux et d'humains ont été recensés dans plusieurs pays (World Health Organization 1999). Les microcystines sont les seules toxines cyanobactériennes pour lesquelles Santé Canada a produit une recommandation : 1,5 µg/L en équivalents de la forme LR dans l'eau potable (Santé Canada 2006). Il s'agit d'une des 75 variantes décrites jusqu'à présent. Tous sont des heptapeptides cycliques qui ne sont pas synthétisés par les ribosomes. L'opéron responsable de leur synthèse comporte dix gènes, qui codent pour un complexe de polycétides-synthases (Mikalsen, Boison et al. 2003).

Dans l'organisme hôte, elles sont transportées au foie où elles bloquent certaines phosphatases, causant des dommages dans le cytosquelette des cellules touchées. Celles-ci s'effondrent, causant des cavités dans les tissus. Elles sont rapidement remplies par du sang : c'est l'hémorragie interne (Carmichael 1994). Le rôle naturel des microcystines fait l'objet de débats. La multiplication des fonctions possibles, la distribution sporadique de la capacité à les synthétiser et les analyses phylogénétiques suggèrent une évolution ancienne, antérieure à l'apparition des phototrophes eucaryotes (Rantala, Fewer et al. 2004; Babica, Blaha et al. 2006).

Tableau 1.1 Rôles hypothétiques de la microcystine

Rôle		Référence
Métabolisme cellulaire	Agent chélatant	(Utkilen et Gjølme 1995; Humble, Gadd et al. 1997)
Interactions	Molécule signal	(Dittmann, Erhard et al. 2001)
	Protection contre les prédateurs	(Rohrlack, Dittmann et al. 1999)
	Allélopathie	(Babica, Blaha et al. 2006)

La production de MC par *Microcystis aeruginosa* est principalement dépendante de la vitesse de croissance (Orr et Jones 1998; Oh, Lee et al. 2000). D'autres facteurs d'importance variable peuvent moduler cette production : disponibilité du fer (Utkilen et Gjølme 1995), pH, salinité, l'âge de la culture et température (World Health Organization 1999). En milieu naturel, par contre, la dynamique de synthèse de MC des cellules individuelles s'estompe dans la variation de la composition de la communauté. Par exemple, dans les lacs des Cantons de l'Est, la présence de MC est corrélée à la concentration en azote totale (TN) et à la biomasse de *Microcystis* et d'*Anabaena* (Giani, Bird et al. 2005; Rolland, Bird et al. 2005). Un modèle purement taxonomique expliquait 64% ($P < 0:0001$) de la variation observée, contre 75% lorsque TN est ajoutée à la régression ($P < 0:0001$) (Rolland, Bird et al. 2005). Les conditions de croissance auraient donc un effet indirect sur la concentration de MC via la dominance variable des genres toxigènes. D'autres études ont trouvé un lien entre la dynamique de la concentration en microcystine et celle des populations toxigènes (Jahnichen, Petzoldt et al. 2001).

De nombreuses méthodes ont été développées pour détecter et quantifier les microcystines. Une des plus populaires est le test immunologique ELISA, pour lequel des plaques sont maintenant commercialisées. L'avantage de cette

méthode est sa sensibilité : en effet, le seuil de détection très bas ne nécessite aucune étape de concentration (Msagati, Siame et al. 2006). Par contre, les anticorps généralement utilisés ont été développés pour détecter la forme LR ; l'interaction variable avec les autres variantes retrouvées en proportions imprévisibles dans un échantillon naturel peut induire des erreurs de mesure (Rapala, Erkomaa et al. 2002).

Le HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) est une autre méthode de détection populaire. Elle permet de détecter de façon quantitative les quelques variantes pour lesquelles des formes pures sont commercialisées. L'organisation internationale de standardisation (ISO) a publié une méthode standard de détection des formes LR, YR et RR (ISO 2005). La détection peut se faire par spectroscopie UV à 238 nm ou avec une batterie de photodiodes (PDA) (Tillmanns, Pick et al. 2007), et l'identification est basée sur le temps de rétention et le spectre d'absorbance. De nombreuses autres méthodes existent; citons une autre méthode de chromatographie (LC-MS) et une méthode de spectrographie (MALDI-TOF) (Msagati, Siame et al. 2006). Finalement, l'inhibition de la phosphatase alcaline est une méthode de mesure biochimique qui sert à estimer la toxicité d'un échantillon. Son principe est simple : on mesure la vitesse d'une réaction colorimétrique inhibée par la MC en présence d'une échelle d'une toxine de référence (généralement la MC-LR) et d'un extrait d'un échantillon (Rolland, Bird et al. 2005; Tillmanns, Pick et al. 2007).

Quelques genres toxigènes

L'identification au microscope reste la référence en matière de taxonomie des cyanobactéries. La classification au sein de genres et d'espèces est en constant changement, en raison des progrès technologiques qui ont permis de démontrer l'hétérogénéité génétique de groupes taxonomiques établis. De plus, la morphologie d'une espèce donnée peut varier selon ses conditions de croissance, rendant d'autant plus difficile son identification (Anagnostidis et Komarek 1985).

Microcystis

Le genre *Microcystis* fait partie de la division des cyanobactéries et de l'ordre des Chroococcales. C'est un photoautotrophe non fixateur d'azote. Il est cosmopolite et est la cause de floraisons dans les eaux douces et eutrophes du monde entier. *Microcystis* est formé d'espèces coloniales planctoniques, de formes variées et caractéristiques (Komarek et Komarkova 2002). Un mucilage transparent, généralement homogène et parfois fortement réfractaire relie les cellules de façon irrégulière. Celles-ci, sphériques ou hémisphériques, se divisent par fission binaire sur trois plans perpendiculaires. Toutes les espèces possèdent des vésicules gazeuses, groupées en aérotopes ; ceux-ci leur confèrent le pouvoir de contrôler leur flottabilité, un avantage écologique substantiel (Komarek et Komarkova 2002).

L'espèce type est *M. aeruginosa*. C'est la seule, à ce jour, dont le génome a été séquencé en entier (Kaneko, Nakajima et al. 2008). Elle forme des colonies microscopiques composées de cellules ((3)4-6(9,4) μM) densément regroupées (Komarek et Komarkova 2002). La forme des colonies est le principal critère de

spéciation : allongées, lobées ou sphériques, elles contiennent généralement des trous distincts. Ceci complique fortement son identification, selon le stade du cycle de vie du spécimen. En effet, les colonies jeunes seront généralement très denses et rondes, alors que les plus vieilles se désagrègent. Le mucilage est diffuent, transparent, et difficile à observer sans coloration (par opposition à celui de *M. wesenbergii*, très réfractaire en contraste de phase) (Komarek et Komarkova 2002).

Dans les zones tempérées, *Microcystis* est typique des eaux stagnantes et eutrophes si communes en zone agricole. Il est extrêmement bien adapté aux conditions lumineuses et chimiques de ces lacs. En été, la croissance est très rapide et généralement dépendante de la disponibilité en nutriments (Vézic, Rapala et al. 2002) et en lumière (Kardinaal, Tonk et al. 2007). Durant cette période, la photosynthèse amène une production importante de glucides et de molécules de réserve. Ces molécules sont denses, et leur accumulation modifie la flottabilité des colonies (Kromkamp et Mur 1984). *Microcystis*, de même que plusieurs autres genres de cyanobactéries causant des fleurs d'eau, maîtrisent leur flottabilité grâce à des vésicules gazeuses (Walsby 1969). Celles-ci leur permettent de varier leur position dans la colonne d'eau, afin de rester dans l'épilimnion (où la lumière est plus intense) malgré l'augmentation de densité cellulaire associée à la photosynthèse, et descendre dans le métalimnion, enrichi en nutriments par les sédiments (Ganf et Oliver 1982). Cette propriété explique en partie la dominance de ces cyanobactéries dans les lacs eutrophes stratifiés (Ganf et Oliver 1982).

À l'automne, les colonies sédimentent rapidement. Du glycogène et du polyhydroxybutyrate (PHB) sont notamment stockés dans les cellules. Au printemps, la division cellulaire reprend et de petits amas de cellules sont

recrutés des sédiments, principalement à partir des zones littorales (Brunberg et Blomqvist 2003). Des travaux récents suggèrent que le recrutement en zone pélagique ne serait pas un processus actif (via, par exemple, un changement de densité lié à la consommation des réserves) (Verspagen, Snelder et al. 2004; Verspagen, Visser et al. 2006). Le métabolisme en milieu benthique est possible par respiration aérobie, mais aussi par une variété de voies fermentaires anaérobiques (Stal et Moezelaar 1997). Ceci corrobore l'observation de Boström qui a trouvé que la biomasse benthique de *Microcystis* était égale ou supérieure au maximum atteint durant la phase planctonique (Boström, Pettersson et al. 1989). *Microcystis* ferait donc plus qu'hiberner ; toute une phase de son cycle de vie se déroulerait dans les sédiments (Brunberg et Blomqvist 2002).

Jacoby et al. ont cherché à connaître les facteurs environnementaux associés aux fleurs d'eau de *M. aeruginosa* (Jacoby, Collier et al. 2000). La plupart des éléments relevés dans ce type d'étude s'appliquent à la majorité des genres de cyanobactéries : phosphore total (TP) élevé, rapport N/P faible, température élevée de l'épilimnion (20 à 25°C). La stabilité de la colonne d'eau est aussi souvent citée (Roelke et Buyukates 2001; Msagati, Siame et al. 2006). D'autres facteurs sont considérés comme explicatifs de la dominance des cyanobactéries, telle que la faible disponibilité de la lumière (Smith 1986), une $p\text{CO}_2$ faible et un pH élevé (Shapiro 1990). La plupart de ces corrélations ont été établies avec un nombre d'espèces restreint, et une généralisation à l'échelle de la division doit être envisagée avec prudence (Marinho et de Oliveira 2007). Parmi les cyanobactéries, les non-fixatrices d'azote tel que *Microcystis* dominant généralement lorsque le rapport $\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$ est faible (Blomqvist, Pettersson et al. 1994).

Anabaena

Le genre *Anabaena* fait partie de l'ordre des Nostocales, caractérisés par leur morphologie filamenteuse. Contrairement au genre *Microcystis*, le genre *Anabaena* est très hétérogène. La base de données Algaebase recense présentement 96 espèces reconnues (Guiry et Guiry 2009) ; elles sont polyphylétiques et leur association au sein du genre *Anabaena* pourrait être révisée (Willame, Boutte et al. 2006).

Leurs cellules sont cylindriques ou sphériques et disposées en chaînes spiralées ou droites. La reproduction se fait surtout par fragmentation des trichomes (Komarek 1992). Plusieurs espèces (sub. *Dolichospermum*) possèdent des aérotopes pour maîtriser leur flottabilité (Guiry et Guiry 2009). Des cellules spécialisées sont présentes : hétérocytes capables de fixer l'azote et akinètes, sortes de spores résistantes (Komarek et Zapomelova 2008). Cosmopolites en milieu lacustre, les nombreuses espèces planctoniques peuvent former des fleurs d'eau lorsque les conditions sont propices (Ganf et Oliver 1982) .

Planktothrix

Le genre *Planktothrix* fait partie de l'ordre des Oscillatoriales. Il s'agit de filaments généralement droits, solitaires et planctoniques dans la majorité des cas (Komarek et Agnostidis 2005). Les cellules sont cylindriques, plus larges que longues. Les espèces de ce genre ne produisent ni hétérocytes, ni akinètes. *P. rubescens* et *P. agardhii* sont les deux seules espèces cosmopolites de ce genre (Guiry et Guiry 2009). Les deux sont potentiellement toxiques et peuvent causer des fleurs d'eau. Dotées de vacuoles à gaz, elles se développent souvent dans le métalimnion. Ceci est aussi possible grâce à l'adaptation de leurs systèmes photosynthétiques à de faibles intensités lumineuses et à leur tolérance pour de

faibles températures (Vareli, Briasoulis et al. 2009). De fortes concentrations d'algues toxiques peuvent passer inaperçues lorsque la transparence de l'eau de surface reste bonne. De plus, le risque est d'autant plus grand que la majorité des prises d'eau potable se situent à profondeur suffisante pour éviter les algues épilimnétiques mais pas toujours celles se distribuant dans le métalimnion (Paulino, Valério et al. 2009).

Variations intra-spécifiques

La toxicité d'un bloom donné est encore impossible à prévoir. Les modèles incluant la composition de la communauté cyanobactériennes décrivent bien le risque de toxicité (Rolland, Bird et al. 2005). La variation intra-spécifique est de plus en plus reconnue comme une cause de la variation résiduelle de ces modèles taxonomiques (Wilson, Wilson et al. 2006) : il existe une variation génétique à l'intérieur des espèces taxonomiques ; pour une espèce donnée, certaines souches seront toxiques, d'autres pas (Wilson, Sarnelle et al. 2005). Il n'y a aucun lien entre la morphologie et la toxicité d'une cellule (Mikalsen, Boison et al. 2003; Via-Ordorika, Fastner et al. 2004).

L'opéron *mcy* est responsable de la production de microcystine chez *Microcystis*, *Anabaena* et *Planktothrix*, mais diffère entre ces genres pour les étapes finales de production du polypeptide (Christiansen, Molitor et al. 2008). Son inactivation a comme unique conséquence l'arrêt de production de toutes les variantes de MC chez *M. aeruginosa* (Dittmann, Neilan et al. 1997), mais ceci est controversé. Selon la souche, cet opéron sera fonctionnel, inactif ou absent. Une comparaison phylogénétique entre souches montre qu'un arbre créé à partir de gènes constitutifs classe les souches de façon similaire à un autre bâti à partir des séquences de gènes *mcy* (Rantala, Fewer et al. 2004). Donc, l'opéron *mcy* serait

monophylétique, et l'événement de délétion menant à la création de souches non toxiques serait ancien d'un point de vue évolutif (Christiansen, Molitor et al. 2008).

La présence d'un mélange de souches toxiques et non toxiques chez *Microcystis* est bien documentée (Kurmayer et Kutzenberger 2003). Les autres genres toxiques ne font pas exception à cette règle. *Anabaena* (Beltran et Neilan 2000) et *Planktothrix* (Christiansen, Molitor et al. 2008) ont aussi des souches non toxiques.

La proportion de souches toxigènes chez *Microcystis* a fait l'objet d'une attention particulière (Wilson, Sarnelle et al. 2005). On peut la déterminer de plusieurs manières. La méthode la plus simple consiste à isoler des colonies individuelles, une méthode fastidieuse (Kurmayer, Christiansen et al. 2003). À partir de l'ADN total (extrait de l'eau brute), on peut utiliser le PCR quantitatif, beaucoup plus rapide. On doit alors supposer que toutes les cellules possédant les gènes codant pour une toxine seront toxiques. La proportion de cellules potentiellement toxiques correspond alors au nombre de copies d'un gène toxigène (par exemple : *mcy*) divisé par le nombre de copies d'un gène de référence (par exemple, le 16S) (Kurmayer et Kutzenberger 2003; Vaitomaa, Rantala et al. 2003; Yoshida, Yoshida et al. 2007). Une autre méthode prometteuse est l'analyse de la région ITS (Intergenic Spacer), la section non codante située entre les gènes 16S et 23S, dont la séquence serait reliée à la toxicité de la souche (Janse, Kardinaal et al. 2004; Kardinaal et Visser 2007).

Objectifs

Depuis 2001, des concentrations dépassant les normes pour l'eau potable ont été détectées dans plusieurs lacs du bassin versant de la rivière Yamaska (Giani, Bird et al. 2005; Rolland, Bird et al. 2005). Le lien entre la biomasse des genres toxiques et la concentration de MC retrouvée dans l'eau est bien établi. En effet, à l'échelle du paysage, c'est la présence de cyanobactéries potentiellement toxinogènes qui est le meilleur prédicteur de la toxicité de l'eau (Giani, Bird et al. 2005). L'avancée récente des méthodes de détection moléculaires a montré la présence d'un mélange de souches toxiques et non toxiques de *Microcystis* lors d'événements de floraison (Kardinaal et Visser 2007; Rinta-Kanto, Konopko et al. 2009). L'étude de Kardinaal et Visser a établi un lien entre la proportion de souches toxiques de *Microcystis* et la concentration en microcystine dans un seul lac, dans lequel aucun autre genre toxique n'était présent (Kardinaal et Visser 2007). Aucun lien n'a été trouvé pour les lacs où il y a co-dominance des genres *Microcystis* et *Anabaena*. Au Québec, aucune étude n'a encore utilisé de méthodes moléculaires afin de caractériser la population de cyanobactéries lors d'événements de floraisons.

Le premier objectif de la présente étude est d'implanter des méthodes moléculaires de caractérisation des cyanobactéries potentiellement toxiques afin de déterminer si plusieurs souches de *Microcystis* cohabitent dans les lacs de la Haute-Yamaska. Notre hypothèse de travail est la présence de plusieurs souches, probablement plus d'une dizaine. Ensuite, la dynamique de la succession de ces souches doit être déterminée et comparée entre lacs. Nous anticipons une certaine synchronie dans cette dynamique, en raison de la similarité (géologie, état trophique) et la proximité (conditions météorologiques) des lacs choisis. Finalement, l'affiliation phylogénétique des

souches doit être comparée entre lacs afin de déterminer si les mêmes souches étaient présentes dans chaque lac. Il y aura probablement des souches identiques dans les lacs reliés par la rivière Yamaska Nord.

En raison de problèmes méthodologiques détaillés au chapitre II, ces objectifs ont dû être modifiés en cours de route. L'emphase s'est déplacée de l'étude de souches de l'espèce *Microcystis aeruginosa*, vers la dynamique de la composition de la population de cyanobactéries. Les détails de ce changement sont expliqués au chapitre II.

CHAPITRE II

VALIDATION DES OUTILS MOLÉCULAIRES VISANT LA VISUALISATION DE LA SUCCESSION SAISONNIÈRE DES CYANOBACTÉRIES TOXIQUES

Introduction

Invisibles à l'œil nu et avec une population globale estimée à 10^{30} cellules, l'étude des procaryotes présente un défi de taille (Whitman, Coleman et al. 1998). Les méthodes de culture classiques donnent une image très biaisée de la communauté, puisque la plupart des bactéries ne sont pas cultivables (Ward, Weller et al. 1990). Ceci justifie notre choix des méthodes moléculaires, qui ont radicalement changé la compréhension de ces communautés depuis leur apparition (Dorigo, Volatier et al. 2005).

Le genre *Microcystis* ne fait pas exception, et notre compréhension de sa composition a largement changé depuis l'avènement de ces méthodes. En effet, la classification traditionnelle, basée sur des critères taxonomiques, ne reflète que partiellement les véritables différences entre les espèces. La variabilité phénotypique associée à un même génotype avait déjà été mise en évidence par des expériences en culture de *Merismopedia* (Palinska, Liesack et al. 1996).

Otsuka et collaborateurs ont ensuite montré que la morphologie du genre *Microcystis* est aussi très variable (Otsuka, Suda et al. 2000). En 2001, ils publiaient une proposition de révision du Code international de nomenclature botanique, afin d'unifier les cinq espèces de *Microcystis* (Otsuka, Suda et al. 2001). D'autres études ont analysé le gène 16S (Neilan, Jacobs et al. 1997), la région entre le 16S et le 23S (Yoshida, Yoshida et al. 2008), la région du gène *cpcBA* (Bolch, Blackburn et al. 1996) la réassociation d'ADN (Kondo, Yoshida et al. 2000), diamètre des cellules et %G-C (Otsuka, Suda et al. 1999). Aucune n'a établi de lien entre ces caractéristiques et la taxonomie actuelle.

L'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – DGGE) est une méthode répandue d'évaluation qualitative et semi-quantitative de la diversité et de la dynamique des populations microbiennes (Muyzer, De Waal et al. 1993; Dorigo, Volatier et al. 2005). Sa popularité s'explique par son coût relativement faible, sa rapidité d'exécution et l'interprétation relativement facile des résultats obtenus (Nocker, Burr et al. 2007). Cette méthode est cependant limitée à plusieurs niveaux. Ce chapitre vise à décrire en détail les protocoles suivis et à présenter les tests de validation effectués.

Le premier problème concerne l'utilisation d'échantillons naturels hétérogènes provenant du terrain. Ce type de matériel entraîne une efficacité variable de l'extraction de l'ADN à cause du cocktail de contaminants présent dans l'échantillon. Ceci peut avoir un impact sur le résultat de l'analyse DGGE (Marzorati, Wittebolle et al. 2008). Tester cette possibilité dépassait le cadre de

ce projet. La méthode d'extraction décrite dans la méthodologie détaillée est cependant standardisée et éprouvée.

L'amplification sélective du gène d'intérêt est une réaction compétitive dont le succès dépend de la qualité des amorces utilisées (Nocker, Burr et al. 2007). Ces dernières sont quelquefois considérées comme « universelles ». La réalité est plus complexe, alors que pour des conditions données, l'amplification sera plus ou moins efficace selon l'espèce (Forney, Zhou et al. 2004). Ce problème est abordé dans la section sur la spécificité des résultats.

Nonobstant la spécificité de l'amorce, le produit d'amplification dépendra de l'abondance de la séquence dans l'échantillon initial, ce qui exclura les espèces représentant moins de 0,1-1% sur l'image DGGE obtenue (Muyzer, De Waal et al. 1993). Les souches étant identiques morphologiquement, aucun test de représentativité n'a été utilisé dans le cadre de ce projet. La reproductibilité est aussi variable. Dans le cas de gels DGGE, les méthodes d'analyse d'images qui génèrent des données quantitatives sont pratiquement impossibles à comparer entre laboratoires, sinon entre utilisateurs (Fromin, Hamelin et al. 2002). Un test de répétabilité est présenté dans les résultats. Ces limitations, générales et applicables à cette étude, doivent être prises en compte lors de l'analyse des données obtenues.

Méthodologie détaillée

Extraction de l'ADN

Toutes les manipulations en aval de l'échantillonnage ont été effectuées avec du matériel stérile. Le protocole d'extraction utilisé (Hisbergues, Christiansen et al. 2003) a été modifié par le Conseil National de Recherche du Canada (CNRC - N. Fortin, comm. pers.). Des filtres de polyéthersulfone (SUPOR-200, $0.2 \mu\text{m}$, 47 mm) ont été utilisés pour filtrer l'eau brute et conservés à -80°C . Le jour de l'extraction, ils ont été coupés en deux et insérés dans des tubes Eppendorfs avec du tampon de lyse (annexe 1), avant d'être incubés à 60°C pour seize heures. Un traitement au lysozyme (5 mg ml^{-1} , 37°C , 60 min) et à la protéinase K (20 g L^{-1} , 37°C , 120min) s'ensuivit. Les filtres ont ensuite été dissous par addition de Phénol:Chloroforme:Alcool Iso-amylque 25:24:1 (v:v:v) à 60°C . Le mélange obtenu a été centrifugé, et la phase supérieure a subi deux autres extractions-centrifugations, la première fois avec le même mélange et ensuite avec du Chloroforme : Alcool Iso-amylque 24:1 (v:v). L'ADN a ensuite été précipité à l'éthanol 100%, lavé à l'éthanol 70% et resuspendu dans du tampon TE (annexe 1) pour conservation à long terme (-20°C). La qualité du produit a été vérifiée sur gel d'agarose-EtBr (Fig 2.1). Une unique bande droite et nette était interprétée comme un produit pur (par ex. #69 A et B). Les bandes plus larges et très brillantes étaient généralement contaminées au phénol (par ex. #71A et B). Dans ce cas, une étape supplémentaire de lavage au Chloroforme : Alcool Iso-amylque 24:1 (v:v) a été effectuée jusqu'à obtention d'un produit propre.

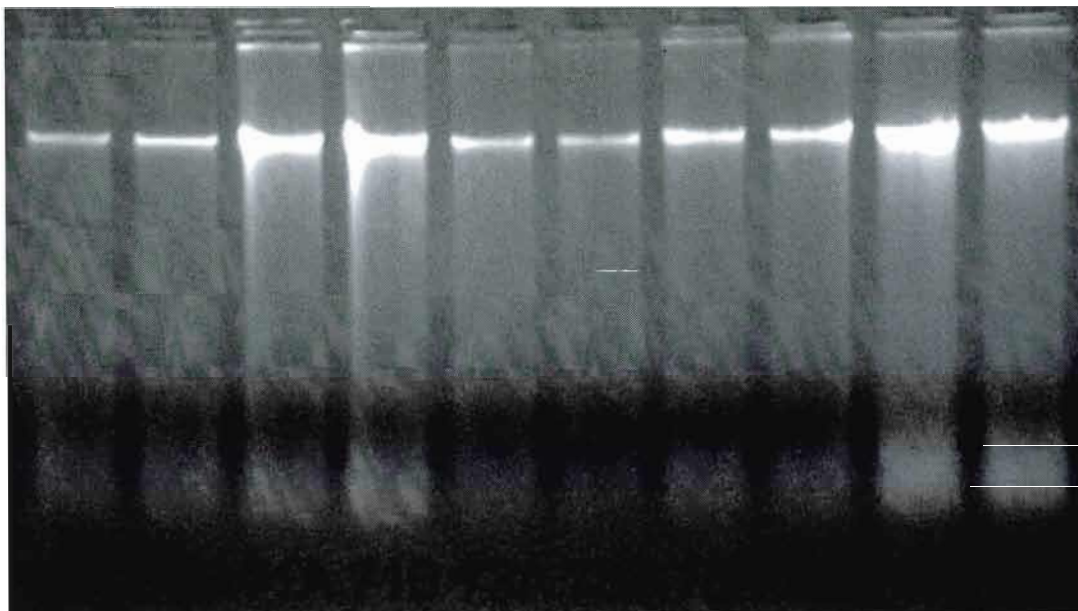
Figure 2.1

Figure 2.1 Exemple d'un gel d'agarose-EtBr pour vérification des produits d'extraction. Le numéro de l'échantillon est suivi de la lettre du réplicat.

PCR et amorces

Dans le cadre de cette étude, les amorces CYA-MIC, développées par le CNRC, ont été utilisées (N. Fortin, comm. pers.). Initialement conçues pour amplifier sélectivement le genre *Microcystis*, ces amorces détectent également plusieurs autres genres de cyanobactéries potentiellement toxiques. Cette particularité des amorces, révélée après la réalisation du travail de terrain et d'une bonne partie du travail en laboratoire, est à l'origine du changement dans l'orientation de ce projet.

La cible des amorces CYA-MIC est une région de ~280 pb du gène codant pour la sous-unité 16S du ribosome. Cette région, très conservée, est très utilisée en

phylogénie et de très nombreuses séquences sont disponibles dans les bases de données publiques (Olsen, Lane et al. 1986; Muyzer, De Waal et al. 1993) Chez *Microcystis*, les régions amplifiées sont situées aux positions 1 885 814–1 890 709 et 3 593 859–3 598 753, et suivent la séquence 16S-*trnI*-23S-5S (Kaneko, Nakajima et al. 2008). L'amorce MIC-F-GC contient une longue séquence riche en GC (tableau 3.1) qui vise à améliorer la performance du gel DGGE. L'amplification PCR a eu lieu dans un iCycler (Biorad) avec le programme qui suit :

Tableau 2.1 Programme PCR utilisé pour l'amplification du gène codant pour la sous-unité 16S du ribosome

Cycle	Répétitions	Température (°C)	Temps (min)
1	1	95	1
2	30	95	1
		58	0 :55
		72	1
3	1	72	10
4	1	4	∞

Afin d'obtenir un signal adéquat sur le gel DGGE, les produits PCR ont été quantifiés pour s'assurer de déposer une quantité égale de 250 ng par échantillon. Dans le cas où la quantité de produits PCR d'une réaction était insuffisante, une série de réactions étaient combinées et précipitées dans l'éthanol afin de reconstituer un échantillon plus concentré. Le dosage a été effectué sur gel d'agarose-Etbr avec du « Low Mass DNA ladder » (Sigma), et les concentrations calculées d'après l'image obtenue avec le logiciel Quantity-One (Biorad) (Fig 2.2). Les bandes extraites du gel DGGE ont été amplifiées à nouveau et séquencées avec l'amorce sans GC (CYA-MIC-F).

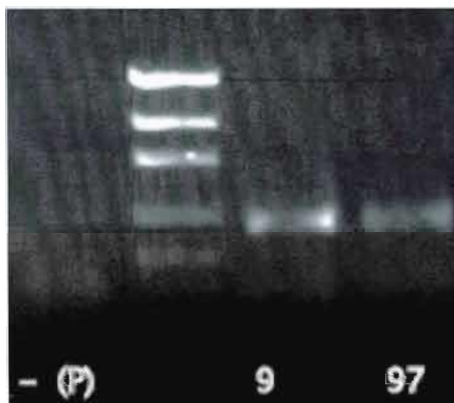
Figure 2.2

Figure 2.2 Exemple d'un gel d'agarose-EtBr pour quantification des produits d'amplification. La voie de gauche est un contrôle négatif pour lequel aucun ADN n'a été ajouté au mélange réactionnel. L'échelle (au centre) est suivie d'échantillons numérotés (à droite).

Électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE)

L'appareil utilisé lors de cette étude est de marque CBS Scientific, modèle DGGE-2401. Le gradient de concentration de l'agent dénaturant était de 40% à 75% (annexe 1), et la migration s'est faite à 80V et 60°C pendant quinze heures dans du tampon TAE (annexe 1). Les gels ont ensuite été révélés avec du Sybr-Gold pendant 45 minutes, rincés et photographiés à la lumière ultra-violette. Les bandes identifiées étaient coupées avec un scalpel stérile et gardées dans de l'eau distillée à 4°C pendant 24 heures avant d'être congelées.

Les images obtenues ont été analysées avec le logiciel Quantity-One (v.4.4.1, Biorad) (exemple Fig. 2.4). Les voies (lanes) étaient d'abord cadrées, puis leur bruit de fond modélisé par la méthode du « rolling disk » afin d'en éliminer l'effet. Les bandes ont été détectées automatiquement, mais révisées à la main. L'association de bandes (match) a été faite à la main en respectant le plus possible les suggestions du logiciel. Les pics d'intensité correspondants aux bandes ont ensuite été modifiés selon le modèle de Gauss, afin de ne pas sous-représenter les bandes situées près les unes des autres. Finalement, l'intensité relative (l'intensité de la bande divisée par l'intensité de toutes les bandes de la voie) a été retenue comme unité de mesure. Toutes les analyses ultérieures portent donc sur l'intensité proportionnelle des bandes et non sur leur fluorescence absolue.

La matrice finale est un amalgame du « All Lanes Report » et du « Band Type Report », avec des 0 où un type de bande est absent et son intensité relative lorsqu'elle est présente dans une voie. Les valeurs ont été normalisées par transformation ($\arcsin \sqrt{x}$) avant l'analyse (Ramette 2007).

Analyses statistiques

Une stratégie de comparaison de matrices a d'abord été retenue afin d'analyser les patrons DGGE. Le logiciel Primer-E (version 5) a servi à calculer les corrélations entre facteurs explicatifs et expliqués. Les matrices d'intensité relatives des bandes DGGE ont été converties en matrices de similarité via la méthode de Bray-Curtis. La même méthode a été utilisée pour les abondances taxonomiques (ces résultats sont présentés au chapitre III). Les matrices de concentrations de toxines ont été converties selon la distance euclidienne normalisée (Legendre et Legendre 1998).

La première approche consistait à comparer les matrices de similarités entre elles (Alonso-Saez, Aristegui et al. 2007). Pour ce faire, la fonction RELATE a servi à calculer la force de leur corrélation. Cette fonction ressemble à un test de Mantel, mais utilise le coefficient de Spearman (ρ). 999 permutations ont été effectuées au hasard afin de déterminer la signifiante du résultat, et le α calculé correspond à la proportion de ces permutations dont le résultat est le même que celui obtenu avec les vraies matrices.

La deuxième approche utilisée linéarise l'analyse par l'utilisation des composantes principales (PCA) des matrices de similarités. L'analyse par PCA calcule des valeurs synthétiques qui sont des combinaisons linéaires des variables originales (Ramette 2007). Par la suite, celles-ci ont servi à faire une analyse de redondance (RDA) partielle afin de partitionner la variation du patron de MC par les bandes DGGE et les abondances taxonomiques. Cette analyse donne donc trois résultats : la proportion de la variation de MC expliquée par chacune des variables indépendantes (patrons DGGE et taxonomie) en plus de la variation totale expliquée par la combinaison de ces variables. Les composantes principales ont d'abord été sélectionnées par « forward stepwise » ($\alpha=0,01$). Un test de permutations a servi à déterminer la signifiante des résultats.

Enfin, la dynamique des patrons DGGE et taxonomiques a été examinée en calculant la vitesse de changement (Marzorati, Wittebolle et al. 2008).

$$\frac{100 - \% \text{ similarité avec l'échantillon précédent}}{\text{Nombre de jours entre les échantillons}}$$

On obtient un indice qui permet de déterminer les périodes de stabilité et de variations brusques dans la composition des bandes (DGGE) et de la communauté phytoplanctonique (taxonomie).

Validation des résultats

Répétabilité

Les analyses DGGE ont été répétées afin de vérifier la constance des résultats obtenus. La nature de la méthode complique en effet la comparaison des résultats. La fabrication du gel, si minutieuse soit-elle, implique une variabilité de la position absolue des bandes. Une standardisation poussée est nécessaire afin de comparer deux gels, et cette opération n'a pas été jugée nécessaire dans le cadre de ce projet. La vérification se fait donc en aval, sur les indices de similarité (Bray-Curtis) obtenus entre paires d'échantillons. La figure 2.3 compare les indices de similarités entre paires d'échantillons pour deux analyses, A et B. L'analyse A provient des gels de séries temporelles effectués pour un lac à la fois. L'analyse B regroupe les mêmes échantillons, répartis sur des séries temporelles plus courtes qui visaient à comparer les lacs entre eux. Les amplifications PCR sont distinctes. La différence n'est pas significative entre les moyennes des analyses ($\alpha = 0,05$) lorsque les données sont considérées dans leur ensemble. Il est cependant clair que les analyses ne sont pas équivalentes, notamment pour les lacs Roxton et Waterloo où l'analyse A produit des coefficients de similarité plus élevés. Seule l'analyse A (les séries temporelles incluant toute la saison, un seul lac par gel) a donc été retenue pour comparaison avec les résultats taxonomiques et la toxicité.

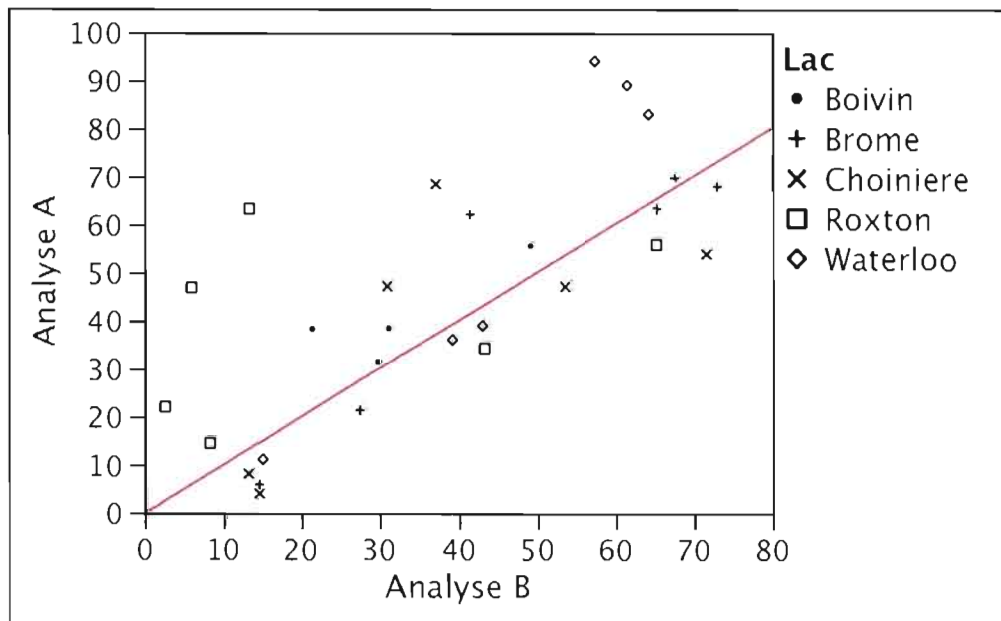
Figure 2.3

Figure 2.3 Comparaison entre les indices de similarité obtenus lors de deux analyses distinctes A et B. Chaque point correspond à la similarité entre deux mêmes échantillons (même extraction, amplifications séparées), analysés sur deux gels distincts (A et B). La ligne correspond à la relation 1:1.

Spécificité

La fonction RELATE du logiciel Primer a été utilisée pour comparer les matrices de similarité entre échantillons générés par DGGE et à partir des décomptes taxonomiques (ces derniers sont présentés au chapitre III).

Tableau 2.2 Corrélations des décomptes taxonomiques et des données moléculaires

Lac	Rho (Spearman)	Significance
Boivin	0,605	0,005
Brome	-0,089	0,646
Choinière	0,640	0,006
Roxton	0,339	0,080
Waterloo	0,414	0,087

Les matrices des lacs Boivin et Choinière sont significativement corrélées, et celles des lacs Roxton et Waterloo sont marginalement corrélées. Dans ces cas, l'information relayée par les patrons DGGE et les décomptes taxonomiques se recoupent en partie. Le lac Brome est clairement à part, avec aucune corrélation entre ces matrices.

Afin de vérifier la spécificité de la méthode, une analyse phylogénétique a été entreprise à partir des séquences des bandes obtenues pour les lacs Brome et Waterloo. Les bandes obtenues tel que décrit dans la méthodologie détaillée ont été amplifiées à nouveau avec les mêmes amorces et le même protocole utilisé précédemment. Le séquençage a été fait par la Plate-forme d'analyses biomoléculaires de l'Université Laval. Ces bandes sont codées br.numéro (Brome) et w.numéro (Waterloo), respectivement.

Les séquences ont d'abord été recherchées dans l'outil BLAST (Altschul, Madden et al. 1997). Pour chaque bande, les deux séquences provenant de la littérature

obtenant les meilleurs scores ont été ajoutées à la base de données. Elles sont présentées par leur numéro d'accès, suivi de leur nom. Toutes les bandes séquencées s'apparentaient à des cyanobactéries. Certaines souches, isolées de nos lacs et conservées en culture, ont aussi été analysées afin d'en extraire la séquence d'intérêt (Annexe II). Elles sont codées ainsi : s-numéro-espèce-lac.

Le logiciel MacVector (version 7.2, Accelrys) a été utilisé pour comparer les séquences obtenues. Celles-ci ont d'abord été alignées grâce à l'outil ClustalX, puis les extrémités ont été exclues de l'analyse (pour que tous les brins aient la même longueur). Les distances de Jukes-Cantor ont servi à construire les arbres selon la méthode de « Neighbor-Joining ». Un arbre par lac a été produit, en utilisant systématiquement toutes les séquences de références (souches cultivées et résultats BLAST). La séquence du gène 16S d'*Aquifex pyrophilus* a servi à enraciner l'arbre (Lac Brome : Fig. 2.4 et Lac Waterloo : Fig 2.5).

Figure 2.5

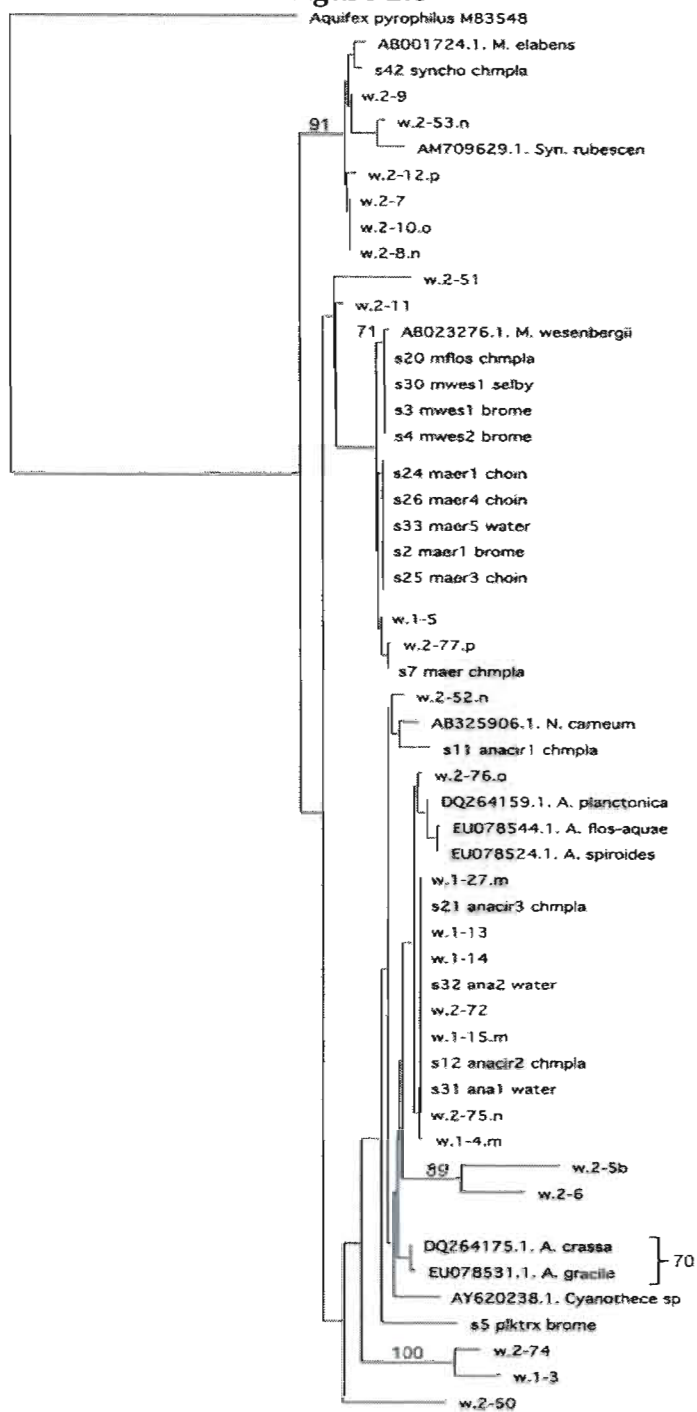


Figure 2.5 Arbre phylogénétique des séquences obtenues du lac Waterloo

L'analyse de ces arbres phylogénétiques permet d'associer certaines bandes à un genre de cyanobactéries. Une bande se retrouvant dans le même groupe (*cluster*) qu'une bande de référence s'est vu attribuer le genre correspondant. Seul l'arbre phylogénétique du lac Waterloo associe des bandes au groupe des *Microcystis*. En effet, la plupart des séquences sont associées avec *Anabaena* ou *Synechococcus*. La figure 2.6 détaille l'identité des bandes séquencées pour ce lac.

Figure 2.6

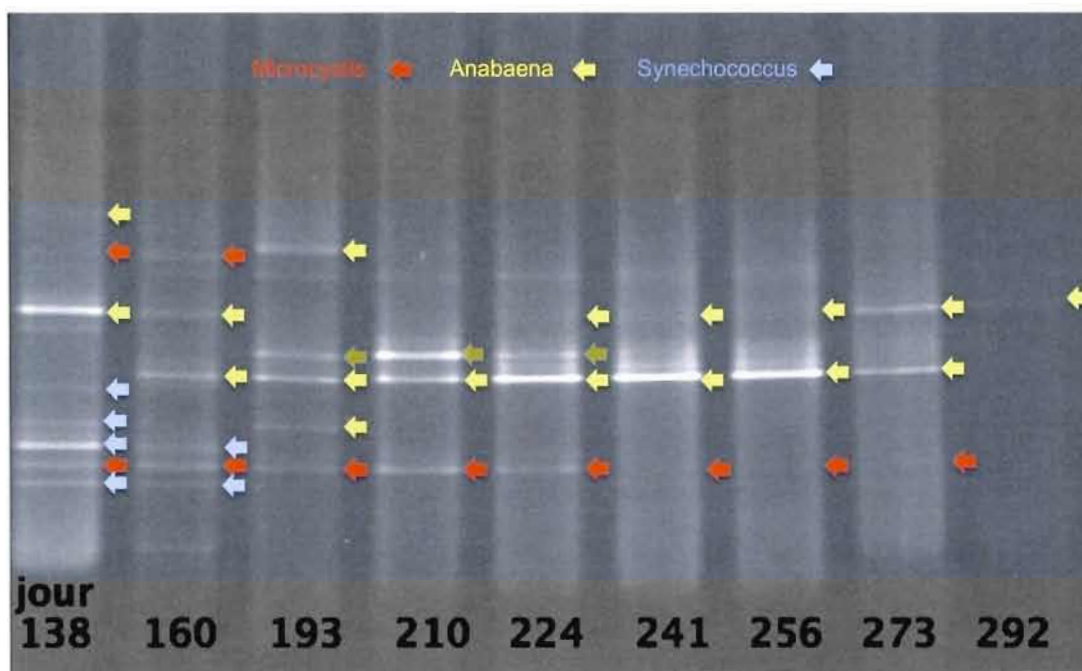


Figure 2.6 Gel DGGE des produits PCR CYA-MIC et identification des bandes séquencées pour le lac Waterloo

Conclusion

Le premier objectif de ce travail était de déterminer si les populations de cyanobactéries du genre *Microcystis* sont composées d'une multitude de souches dans les lacs de la Haute-Yamaska. Le faible nombre de bandes associées à *Microcystis* lors de nos analyses phylogénétiques suggère qu'il n'y a pas de diversité intra-spécifique dans ces lacs.

Par contre, la validation de la méthode d'analyse par DGGE limite la portée de ce résultat. En effet, la mauvaise spécificité de l'amorce pour *Microcystis*, combinée au faible polymorphisme du gène 16S chez ce genre, nous oblige à mettre en doute la capacité de la méthode à analyser la diversité intra-spécifique. La poursuite de cet objectif requerrait la reprise des travaux au laboratoire. La première étape serait le développement de nouvelles amorces plus spécifiques au genre *Microcystis*, en ciblant un gène alternatif (par ex. la région ITS décrite au chapitre I). Une nouvelle validation de ces amorces, suivi d'une reprise de l'analyse des échantillons de terrain nous permettrait de confirmer l'absence d'une dynamique des souches de *Microcystis* dans les lacs de la Haute-Yamaska. Le manque de matériel génétique à amplifier, de ressources et de temps nous contraint cependant à nous en tenir aux résultats présentés.

En revanche, notre analyse phylogénétique révèle que les autres genres amplifiés sont pour la plupart potentiellement toxiques ; une étude basée sur la modélisation de la toxicité à partir des abondances taxonomiques au genre, comparable à celles de Giani et al. (Giani, Bird et al. 2005) et de Rolland et al (Rolland, Bird et al. 2005) est donc envisageable. Dans ce contexte, les résultats taxonomiques et moléculaires seront considérés comme complémentaires dans

l'étude de la dynamique des communautés de cyanobactéries toxiques des lacs, présentée au chapitre III.

CHAPITRE III

TEMPERATURE-RELATED DYNAMICS OF TOXIC CYANOBACTERIAL COMMUNITIES IN THE YAMASKA RIVER BASIN

Alexandre Guindon*, Rocio Aranda-Rodriguez, Nathalie Fortin, Hongmei Jing and
David Bird*

*Département des Sciences Biologiques, Université du Québec à Montréal, Case
Postale 8888, succursale Centre-Ville, Montréal, QC, H3C 3P8, Canada.

Note : Les références citées dans le texte sont intégrées à la bibliographie
générale à la fin du document

ABSTRACT

Toxins such as microcystins (MC) are the main public health concern over cyanobacterial blooms. The resulting toxicity is related to the dominance of potentially toxigenic genera, and thus to the composition of the planktonic community. To investigate this relationship, five lakes of the Yamaska river basin (southern Quebec) were sampled in the summer of 2007. Community composition was monitored using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) following amplification of the 16S gene of water column DNA extractions. Microscopic enumerations were also performed. Cyanobacterial toxin concentrations were determined using an immunological method (ELISA) and chromatography (HPLC). Results confirm the association of potentially toxigenic genera to MC concentrations. These correlations are best computed using taxonomic data, with an r^2 aj. reaching 0.64 ($p < 0.0001$). DGGE data was found to explain a similar portion of the variation with an RDA analysis. Community dynamics were also investigated: stable community composition was associated with higher toxicity in 2 of the 5 lakes. This stability, expressed as the rate of community change, was also correlated with higher temperature (r^2 adj. = 0.21 for DGGE et 0.28 for taxonomy, $p < 0.005$).

INTRODUCTION

Mass occurrences of cyanobacteria can severely limit both recreational use and consumption of fresh water. The resulting water quality issues, such as decreasing water clarity, bottom water oxygen depletion, and public health concern over toxins have created a major environmental crisis in Quebec in recent years. A very common toxin, hepatotoxic microcystin (MC) has been reported as regularly exceeding guideline levels in freshwater lakes around the world. When ingested, microcystins are transported to the liver, where they block protein phosphatases 1 and 2A, leading to increased protein phosphorylation (Yoshizawa, Matsushima et al. 1990), notably of cytokeratins. These proteins play a role in microfilament organization; their hyperphosphorylation induces changes in cell integrity and cell-to-cell binding, resulting in hemorrhaging in the liver (Ohta, Nishiwaki et al. 1992). Other described effects are increased cell apoptosis (McDermott, Nho et al. 1998), genotoxicity (Zegura, Lah et al. 2004) and tumor promotion (Falconer and Humpage 1996).

Toxin production is associated with three main MC-producing genera in Quebec: *Anabaena*, *Microcystis* and *Planktothrix*. Phytoplankton ecologists do not yet have a good understanding of the biotic interactions and abiotic forcing that shape aquatic microbial communities and permit these potentially harmful genera to dominate the community. Changes in phytoplanktonic communities are often seasonal, due to the influence of air temperature and solar radiation intensity over water vertical structure (Sommer 1989). For a given eutrophication level, occurrence of dominant species can sometimes be a product of external forcing (Pannard, Bormans et al. 2008), when uniform

weather changes introduce synchrony in their dynamics at the landscape scale (Kent, Yannarell et al. 2007).

Microscopic identification and biovolume estimation is still the preferred method for bloom monitoring. A number of molecular detection methods have been used to assess specific and intra-specific changes of toxigenic cyanobacteria. Pearson and Neilan recently reviewed these (Pearson and Neilan 2008), citing 16S rRNA as adequate for identifying potentially toxic genera. The conservation of sequences, combined with the large database accumulated over the years make it a powerful tool to investigate cyanobacteria at the generic level. PCR-DGGE of the 16S rRNA gene is thus a useful complement to classical taxonomic field studies.

The purpose of this study was to evaluate and quantify the links between community dynamics and toxicity in five southern Quebec lakes. Two complementary methods were used and compared to compute indices of change in the community, which were then related to the measured particulate MC concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Study lakes

Five eutrophic lakes, chosen for their tendency to support large summer blooms of cyanoacteria, were sampled in the summer of 2007. Lakes Brome, Waterloo, Roxton and reservoirs Choinière and Boivin are located in the Upper Yamaska River basin, whose land use is about 50% agricultural. Bi-monthly sampling until November followed single visits in May and June. Meteorological data was obtained from Environment Canada (online at <http://www.ec.gc.ca>).

Sample collection and analysis

Sampling was performed in the pelagic zone near the middle of each lake to avoid shoreline accumulations. This corresponds to the deepest point for the lakes (Brome, Waterloo, Roxton), but not for the reservoirs (Choinière, Boivin). Temperature, oxygen and conductivity profiles (YSI 600-XLM, Yellow Springs, OH) were measured, along with pH (Thermo Orion inc., Beverley, MA) and water transparency (Secchi disk and LI-COR, Lincoln, NE). Integrated samples of the photic zone (estimated as twice the Secchi depth) were taken using a series of 1m length Van-Dorn bottles at 1m increments and kept in an 18L plastic bottle. Triplicate subsamples were taken for total and dissolved phosphorus and nitrogen, and duplicates for nitrate, ammonium and dissolved organic and inorganic carbon. Volumes of water appropriate for the particulate content (0.1 to 1L) were filtered on GF/F (Whatman, Maidstone, UK) filters for chl-a and MC analysis, and sterile polyethersulfone filters (0.2 μ m, 47mm, SUPOR-200, Pall

Corp., Ann Arbor, MI) for DNA extraction. Nutrient concentrations were determined as described previously (Giani, Bird et al. 2005).

Subsamples for phytoplankton counts were preserved using Lugol's iodine solution. Counts were limited to cyanobacteria and performed under an inverted microscope using the Utermohl method (Utermöhl 1958). Biovolume ($\mu\text{m}^3 \text{ L}^{-1}$) was estimated using simple geometry and subsequently converted to biomass ($\mu\text{g wet weight L}^{-1}$) (Menden-Deuer and Lessard 2000).

Microcystin extraction and analysis

Microcystin was evaluated using a combination of HPLC and ELISA methods. These yield different results, HPLC being able to discriminate among multiple chemical variants of the microcystin molecule, and the ADDA-specific ELISA being more sensitive to very low concentrations but not distinguishing between the multiple variants (Rapala, Erkomaa et al. 2002). Total MC is therefore the mean of HPLC (all forms summed) and ELISA results.

Filters were extracted by accelerated solvent extraction (ASE) according to a procedure previously described (Aranda-Rodriguez, Tillmanns et al. 2005). Briefly, each filter containing the cyanobacteria was placed in an 11 mL stainless steel ASE cell that was then filled up with hydromatrix. Extraction took place in an ASE 200 (Dionex Co, Oakville, Canada) with 2 cycles of 5 min static extraction at 2000psi and 80°C using 75% methanol. Extracts (27 mL) were spiked with 50 μL formic acid and evaporated using a Zymark Turbovap LV concentrator (Caliper Life Science, MA, USA) and reconstituted with 1 mL of 50 % methanol for further analysis.

The chromatographic separation of extracts was performed using a Shimadzu HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan). Separation was achieved using a Zorbax SB-C18 column (250 mm x 4.6 mm, 5- μ m particle size). The mobile phase and eluting gradient program followed that described previously (Aranda-Rodriguez, Tillmanns et al. 2005). Detection was achieved using a PD40 photo-diode array detector (Dionex, ON, Canada), UV-spectra were acquired from 200 to 300 nm and peak heights recorded at 238 nm. Positive peaks were confirmed when their retention time matched those of the standards (RR, YR, LR, LA, LW and LF) and had the characteristic UV-spectra. Based on the HPLC-PDA results, samples were diluted with deionized water to obtain final concentration within the calibration range of the kit. Tests were performed using Envirologix QuantiPlate test kit for microcystins (Envirologix, Portland, OR) following the manufacturer's instructions. Absorbance was measured at 450/630 nm reference, using a Multiskan Spectrum (Thermo electron Co., Vantaa, Finland).

DNA extraction and amplification

DNA was extracted from whole polyethersulfone membranes using a hot phenol method described by Kurmayer et al (Kurmayer, Christiansen et al. 2003). Amplification was performed with primers (Table 3.1) targeting the 16S region of a series of common cyanobacteria (Table 3.2), as determined by a search using the Primer-BLAST online tool (Rozen and Skaletsky 2000).

Table 3.1 Primers used in this study

CYA-MIC-F	(GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCG CGG CGG GCG GGG CGG GGG) GCT TGC GTC TGA TTA GCT AGT TG
CYA-MIC-R	CGG ACG CTT TAC GCC CAA TAA T (GC clamp between parentheses)

Table 3.2 Genera of cyanobacteria amplified by the primers

<i>Anabaena</i>
<i>Aphanizomenon</i>
<i>Microcystis</i>
<i>Nostoc</i>
<i>Planktothrix</i>
<i>Synechococcus</i>

50 μ L PCR reactions mixtures, containing 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM of each dNTP, 0.3 μ M of each primer (Table 3.1), 0.125 μ g μ L⁻¹ of bovine serum albumin and 1.0 U of rTaq DNA polymerase were processed in a iCycler thermal cycler (Bio-Rad, Hercules, CA). The PCR program had an initial denaturation at 95 °C for 1 minute, followed by 30 amplification cycles of 1 min at 95 °C, 55 seconds at 58 °C, 1 minute at 72 °C, and a final extension at 95 °C for 1 minute. Quantification of the GC-CYA-MIC product was performed using an agarose-EtBr gel image comparison with a low-mass ladder (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO).

Characterization of the cyanobacterial community

Fingerprints of the cyanobacterial 16S gene were generated using a DGGE method (Muyzer, De Waal et al. 1993). 250 ng of amplified DNA was loaded on a 7% polyacrylamide gel, using a linear denaturation gradient (40% to 75%). Electrophoresis was conducted in 1X TAE buffer (pH 8) at 80V for 15 hours (CBS Scientific DGGE-2401, Del Mar, CA). Gels were then stained using SYBR-Gold (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR). Image acquisition and analysis were performed with a Fluor-S MultiImager and Quantity-One software (v.4.4.1, Bio-Rad, Hercules, CA). Lanes and bands were detected automatically, but corrected manually following background subtraction. Band matching was also corrected

by hand when necessary. Band intensities were modelled and compared to Gaussian curves to detect, and avoid under-representation of, closely associated bands. Final output was a matrix composed of band types with their percentage intensities, relative to the summed intensities of all bands in the lane. These were arcsine transformed to homogenize variance.

Duplicates of every band type were excised for Lakes Brome and Waterloo. Reamplification using the same primers was performed, and the resulting products were sent for sequencing (Plate-forme d'Analyses Biomoléculaires, Université Laval, Québec). Phylogenetic affiliation with cyanobacteria of the sequences obtained were confirmed with a) public database DNA sequences using BLAST (Altschul, Madden et al. 1997) and b) cultured *Anabaena sp.* and *Microcystis sp.* strains isolated from the five lakes (data not shown).

Statistical analyses

Linear regressions between MC concentrations and explanatory variables were the first step of the analysis and were performed in JMP 7 (SAS Institute inc., Cary, NC), using \log_{10} -transformed data. Multivariate analysis of community, toxin and environmental variables were initially performed using ordination of similarity matrices. These were generated from untransformed data. The Bray-Curtis similarity index was used for DGGE fingerprints and taxonomic data, while normalized euclidean distances were used for MC variant concentrations.

Variation partitioning was the second multivariate analysis used. It was performed using MATLAB (2009a, The Mathworks, Natick, MA). Briefly, RDAs were calculated using untransformed MC variants concentrations as the Y matrix. X matrices consisted of forward-selected PCoA vectors representing either X₁) biomasses from potentially toxic species or X₂) relative intensities of DGGE bands. P-values were computed using a permutation test based on 999 matrix permutations.

Moving window analysis, expressed as rates of change, is a useful measure of the stability of a microbial community (Possemiers, Verthe et al. 2004). Rates were calculated from dissimilarity values as follows:

$$\frac{100 - \% \text{ Similarity with preceding sample}}{\text{Number of days between samples}}$$

Low rates of change between samples thus represented a succession of very similar communities, herefore referred to as stable communities.

RESULTS

Description and comparisons of the study lakes

Table 3.3 Mean values for morphometric and physicochemical variables of the study lakes over the sampling period in 2007.

	Boivin	Brome	Choinière	Roxton	Waterloo
Area (km ²)	1.6	14.4	4.7	1.8	1.5
Flushing rate (a ⁻¹)	18.9	1.0	1.6	1.8	3.2
Mean depth (m)	3.3	5.9	7.8	3.1	2.9
Secchi (m)	-	3.0	1.8	2.3	1.1
n	9	10	13	9	10
TP (µg L ⁻¹)	69	20	36	33	55
TDP (µg L ⁻¹)	27.7	8.9	11.0	15.76	12.5
TN (µg L ⁻¹)	705	338	604	450	933
TDN (µg L ⁻¹)	464	230	401	333	500
NO ₃ ⁻ (µg L ⁻¹)	58	34	102	22	43
NH ₄ (µg L ⁻¹)	44	45	84	44	201
DOC (µg L ⁻¹)	7.7	3.9	6.3	6.1	7.6
DIC (µg L ⁻¹)	10.0	7.5	9.3	9.3	9.1
pH	8.6	8.3	8.2	8.2	8.6
TN:TP	11	17	18	14	16
TDN:TDP	19	30	39	23	39
NH ₄ :NO ₃ ⁻	4.4	4.6	3.9	4.9	6.4
Chl a (µg L ⁻¹)	4.1	3.3	4.8	1.7	12.2

The mean total phosphorus and nitrogen levels for four lakes were consistent with their classification as eutrophic (using MDDEP criterion), leaving only Brome Lake in the mesotrophic range. Lakes Boivin and Waterloo had significantly higher concentrations of both nutrients, Choinière and Roxton had

intermediate values and Brome was poorest in nutrients (Tukey's HSD test, $\alpha=0.05$). Ammonium values across the seasons in each lake had a highly skewed distribution, with a few very high values. For instance, NH_4 ranged from 22 to $250 \mu\text{g L}^{-1}$ in lake Waterloo, except for October 19th when it reached $1206 \mu\text{g L}^{-1}$. DIC and DOC concentrations were stable in Lakes Brome and Roxton but increased constantly over the sampling period in the other lakes; slightly for Choinière and Boivin and more abruptly for Waterloo. Chlorophyll *a* levels were significantly higher in lake Waterloo than elsewhere. There were no significant differences among the other lakes. While its chl *a* mean was similar, Lake Roxton had a lower standard deviation, owing to an absence of bloom events in 2007.

Cyanobacterial communities

The five lakes had dissimilar dynamics throughout the growing season as shown in Fig 3.1. Boivin reservoir had a rapid increase in cyanobacterial biomass, with a mid-July maximum where potentially toxic *Microcystis aeruginosa* dominated the community. Choinière reservoir had a slower start, with a peak between mid-August and mid-September, followed by a sharp drop in measured biomass. *Aphanizomenon flos-aquae* was the most abundant species there, and was responsible for visible surface scums in August. Lake Waterloo had similar trends to that of Choinière Reservoir, except for a change from *Aphanizomenon flexuosum* dominance early on to a co-dominance by *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena spiroides*. Lake Brome had a very late bloom of *Planktothrix agardhii*, complete with localized surface scums. Lake Roxton had very little cyanobacterial biomass in 2007, and the low chlorophyll *a* measured was mostly cryptophytes and diatoms.

DGGE fingerprints were obtained for all samples. The mean number of bands was 9,24 (min 1, max 22). Lakes could be divided into two groups based on their mean number of bands per sample (Tukey's HSD test, $\alpha=0.05$). Lakes Boivin and Roxton had more bands (mean 13,3 and 11,8 bands, respectively) than Brome and Waterloo (mean 6,5 and 6,1 bands, respectively). Choinière was included in both groups (mean 9,3 bands).

Microcystin concentration

Total microcystin content was generally consistent with the level of toxigenic cyanobacterial biomass (Fig 3.1). Lake Waterloo had a significantly higher concentration of MC than other lakes ($\alpha = 0.05$). It is the only lake in which concentrations exceeded the World Health Organization guideline for drinking water ($1 \mu\text{g L}^{-1}$), from June to September. Boivin Reservoir had much lower concentrations of MC, distributed regularly up to $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Brome and Choinière had low median concentrations ($0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ and $0.04 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively). Brome had a single episode of high toxicity coinciding with the late *Planktothrix* biomass surge. The maximum concentration recorded in Lake Roxton was $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$. Low cyanobacterial biomass led to this barely detectable MC level and as a result Lake Roxton was excluded from further analysis.

Overall, total MC concentrations ranged 0 to $4.9 \mu\text{g L}^{-1}$ (mean : 0.45 , standard deviation : 1.05). Microcystins LR and RR were the most frequently encountered, and were dominant in the lakes with the highest total MC concentrations. A low, unique occurrence of MC-LW was measured in Choinière Reservoir. MC-LA and -LF were not found in any sample. Proportions of the various forms were different for each lake, but fairly consistent over the summer.

Figure 3.1

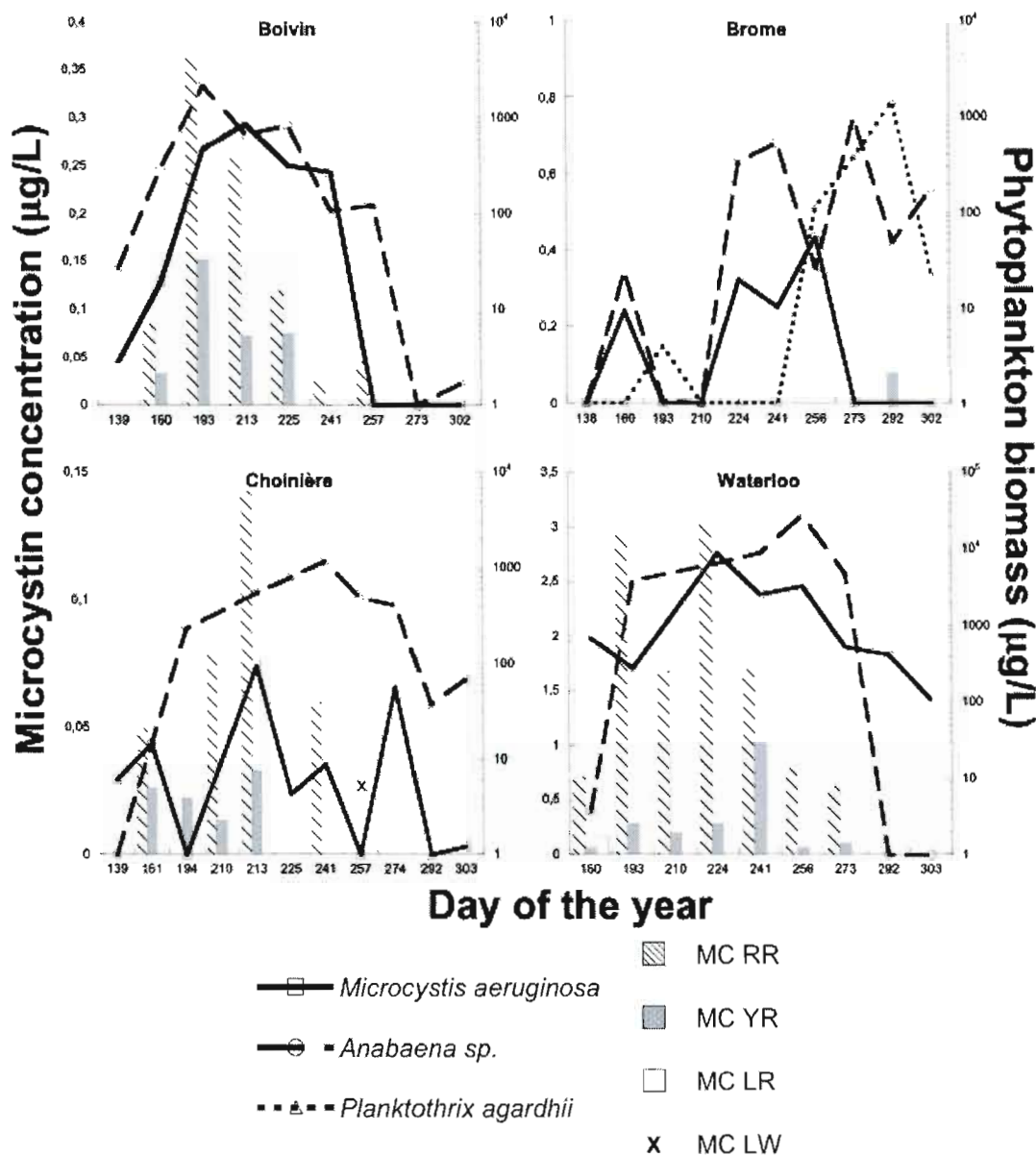


Figure 3.1 Concentration of microcystin and biomass of toxigenic genera over the summer of 2007. Other species within *Microcystis* and *Planktothrix* genera were rarely observed and were thus negligible in terms of algal biomass. Details of *Anabaena* species composition are included in the supplementary material. Note the different MC concentrations and phytoplankton biomass scales for each lake.

Microcystin content of the biomass

Re-expression of MC concentration and cyanobacterial biomass as their respective carbon content allowed comparison of microcystin content between sampling dates (Fig 3.2). Results show a similar trend in Lakes Choinière, Waterloo and Brome, with more MC per unit biomass at the beginning of the season followed by lower values later on. This effect is strongest in Lake Choinière, with MC reaching up to 1.2% of the cell carbon. Lake Boivin had stable MC content throughout. There was no significant difference in mean microcystin content among lakes (Tukey's HSD test, $\alpha=0.05$)

Figure 3.2

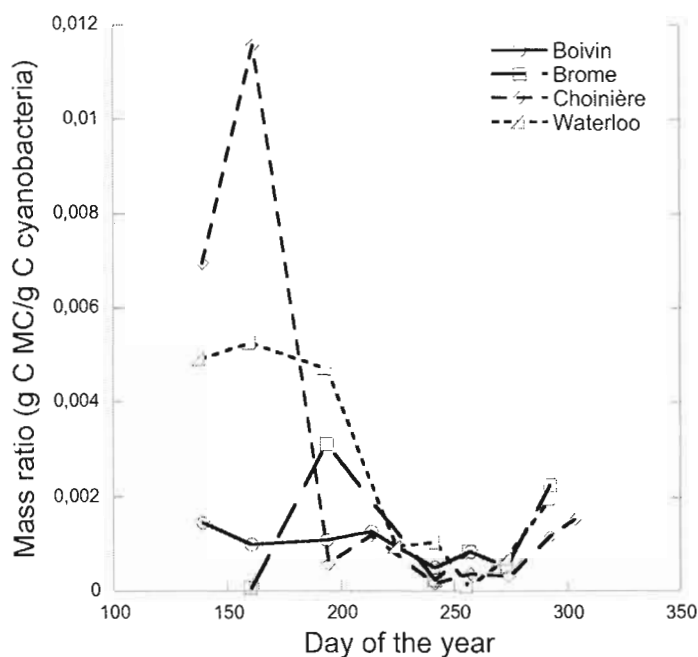


Figure 3.2 Microcystin content, expressed as the fraction of cellular carbon incorporated in microcystin molecules, for each lake and date.

Cyanobacterial community and environmental factors correlations with the measured MC concentrations

Linear regressions

Modeling lake toxicity using taxonomic data at the generic level yielded good results, both within and among lakes (Table 3.4). Correlation strengths were not enhanced by the use of species-level data. Using all lakes and dates, a multiple regression was computed for the three principal toxigenic genera :

$$\log MC = -2,33 + 0.54 \log Microcystis + 0.20 \log Anabaena + 0.17 \log Planktothrix$$

(n = 35, r² adj. = 0.64 , p<0.0001)

Where MC is the total MC concentration (ug L⁻¹) and each genera is expressed as its carbon biomass (ug L⁻¹).

Table 3.4 Correlations with log-transformed total MC (ug L⁻¹). Results are adjusted r² values, with negative slopes when italicized. **: p<0.01 * : p<0.05 No star : p<0.1

	Boivin	Brome	Choinière	Waterloo	Overall
<i>Anabaena</i> (A)	0.67**	0.34	0.25	0.47*	0.29**
<i>Microcystis</i> (M)	0.69**	-0.14	0.17	0.06	0.38**
<i>Planktothrix</i> (P)	-	0.70**	-	-	
Best multiple regression	A&M 0.74**	A&P 0.82**	A&M 0.47*	-	A&M&P 0.64**
TN					0.29**
TP		0.63**			0.22**
TDN			0.34*	0.33*	
TDP			0.22		
NO ₃ ⁻			0.27*		0.15**
DIC		0.61**		0.32	
DOC		0.28			0.14**
Kd		0.40*			0.39**
Secchi		0.51*			0.39**
pH		0.52*	0.44*	0.79**	0.23**

Within-lake modeling of MC concentration was possible for all lakes. Boivin and Choinière had *Microcystis* and *Anabaena* best explaining the toxin variations, although there was collinearity in Boivin. In that case, both genera had similar correlation coefficients whether taken individually (0.67 and 0.69) or collectively (0.74). Only *Anabaena* was correlated with MC in Lake Waterloo, even though that lake had the highest *Microcystis* biomass. There was no correlation of toxin concentration with the ratios TN:TP, TDN:TDP or $\text{NH}_4\text{:NO}_3^-$. Unsurprisingly, nutrients associated with phytoplankton biomass (TN, TP) were most correlated with MC. Similarly, light extinction coefficient (Kd), Secchi depth and pH were all found to be correlated with MC.

Variation partitioning of taxonomic and molecular descriptors

Partitioning of sources of MC variants concentration variance into taxonomic and molecular fractions was possible for Lakes Boivin, Brome and Waterloo (Fig 3.3). Explained variance fraction varied from 0.29 in Boivin to 0.74 in Brome. Brome and Waterloo had markedly different patterns of fractionation, taxonomy and DGGE explaining most of the variance respectively. These factors had similar contributions to the smaller explained variance for Lake Boivin. Forward selection of PCoA vectors describing DGGE band intensity kept a single vector for each lake. Not surprisingly, the first vector (the one describing most of the variation) was chosen for Lakes Boivin (65,8% of the variation) and Waterloo (81,2% of the variation). In contrast, only the third vector (13,25% of the variation) was significant in the RDA for Lake Brome. Only in lake Brome was the RDA strongly significant with a p value of 0.014.

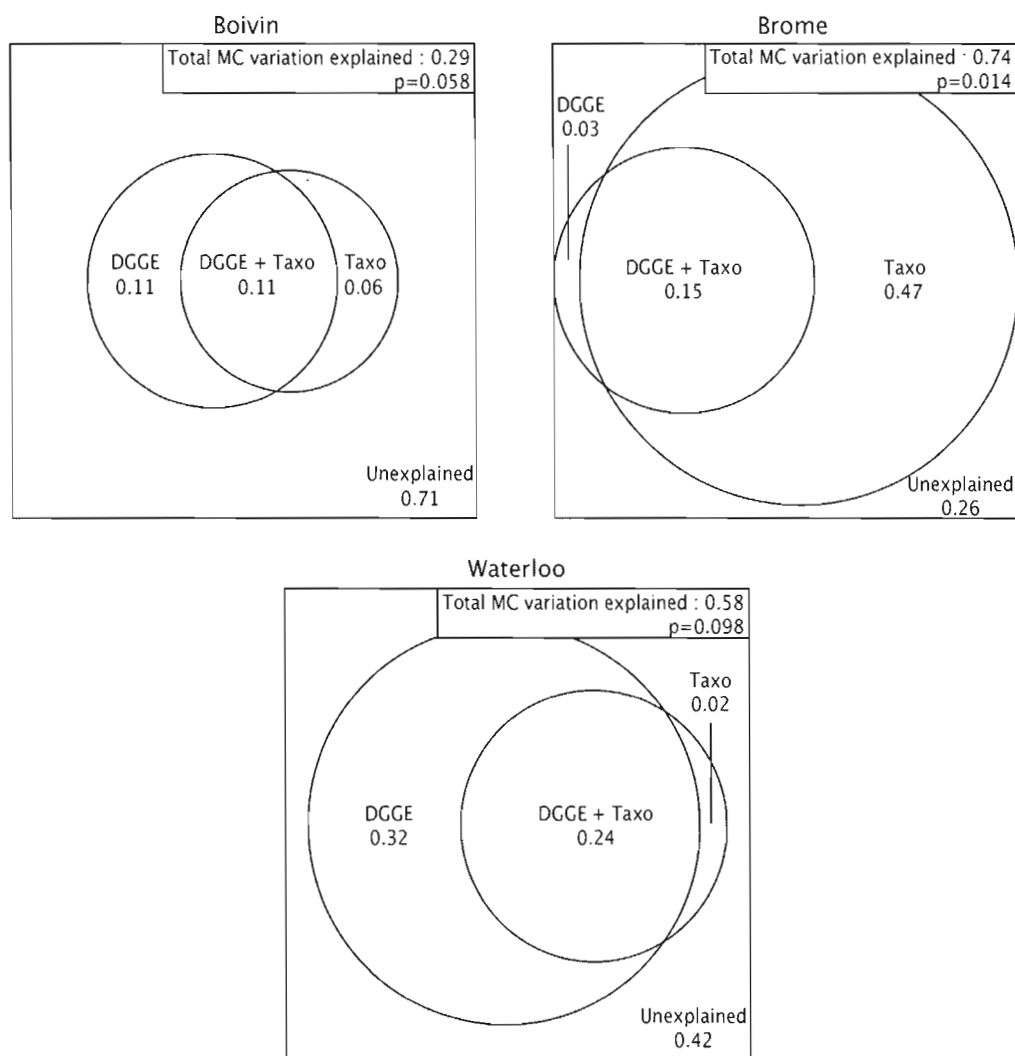
Figure 3.3

Figure 3.3 Partitioning of the variation in MC concentration among molecular and taxonomic descriptors. Circles and squares are scaled to the fraction total variance explained.

Dynamics of the molecular and taxonomic indices

Seasonality of the community dynamics

Mean rates of change of taxonomic and molecular descriptors of the community were similar among lakes (Tukey's HSD test, $\alpha=0.05$), and followed a distinctive seasonal pattern. There was greater amplitude in the community dynamics at either end of the growing season (Fig. 3.4a). This seasonality can be expressed as a correlation ($n=32$, r^2 adj. = 0.21, $p=0.005$) between 16S community rate of change and 5-day averaged air temperature (Fig. 3.4b). Epilimnion temperature ($^{\circ}\text{C}$) was also significantly correlated to rate of community change ($n=32$, r^2 adj. = 0.19, $p=0.007$). Within lakes, this relationship was only significant in Lake Brome ($n=9$, r^2 adj. = 0.54, $p=0.01$).

Taxonomic rate of change was also correlated with temperature, of both air (5 day average - $^{\circ}\text{C}$) ($n=32$, r^2 adj. = 0.28, $p=0.001$) and the epilimnion ($^{\circ}\text{C}$) ($n=32$, r^2 adj. = 0.27, $p=0.001$). We found no correlation of either 16S or taxonomic rates of change with rainfall (previous day total, same day total, and 5 day maximum, minimum and average values) and nutrient concentrations.

Toxicity and dynamics of the communities

Community stability was significantly associated with total MC concentration for 3 of the 4 lakes (Fig. 3.4c). For 16S fingerprints, the relationship was negative (increased MC for decreased rate of change) for Lake Boivin ($n=5$, r^2 adj.=0.83, $p=0.007$) and positive for Lake Brome ($n=8$, r^2 adj.=0.60, $p=0.01$). Another negative relationship was found using stability of the taxonomic community in Lake Waterloo ($n=7$, r^2 adj.=0.49, $p=0.05$). We found no relationship with MC for

the 16S fingerprints in lake Waterloo and for taxonomy in lakes Brome and Boivin.

Comparison between molecular and taxonomic methods of measuring the rate of community change

The rates of change measured with both methods were consistent in their dynamics (Fig 3.4 a). There was no direct correlation between taxonomic and molecular rates of change ($n=29$, r^2 adj. = 0.01, $p=0.25$). A significant correlation does exist if DGGE results are lagged by one sampling event, effectively associating them with taxonomic results from the next date ($n=22$, r^2 adj. = 0.32, $p=0.004$) (Fig. 3.4d). To establish this relationship, only sampling events from July onwards were used (when sampling was at regular 2 weeks intervals). Within lakes, only Boivin shows a significant correlation ($n=5$, r^2 adj. = 0.73, $p=0.04$). It is possible, as outlined below, that 16S fingerprinting of the cyanobacterial community has predictive value for the speed of community changes of taxonomic species.

Figure 3.4

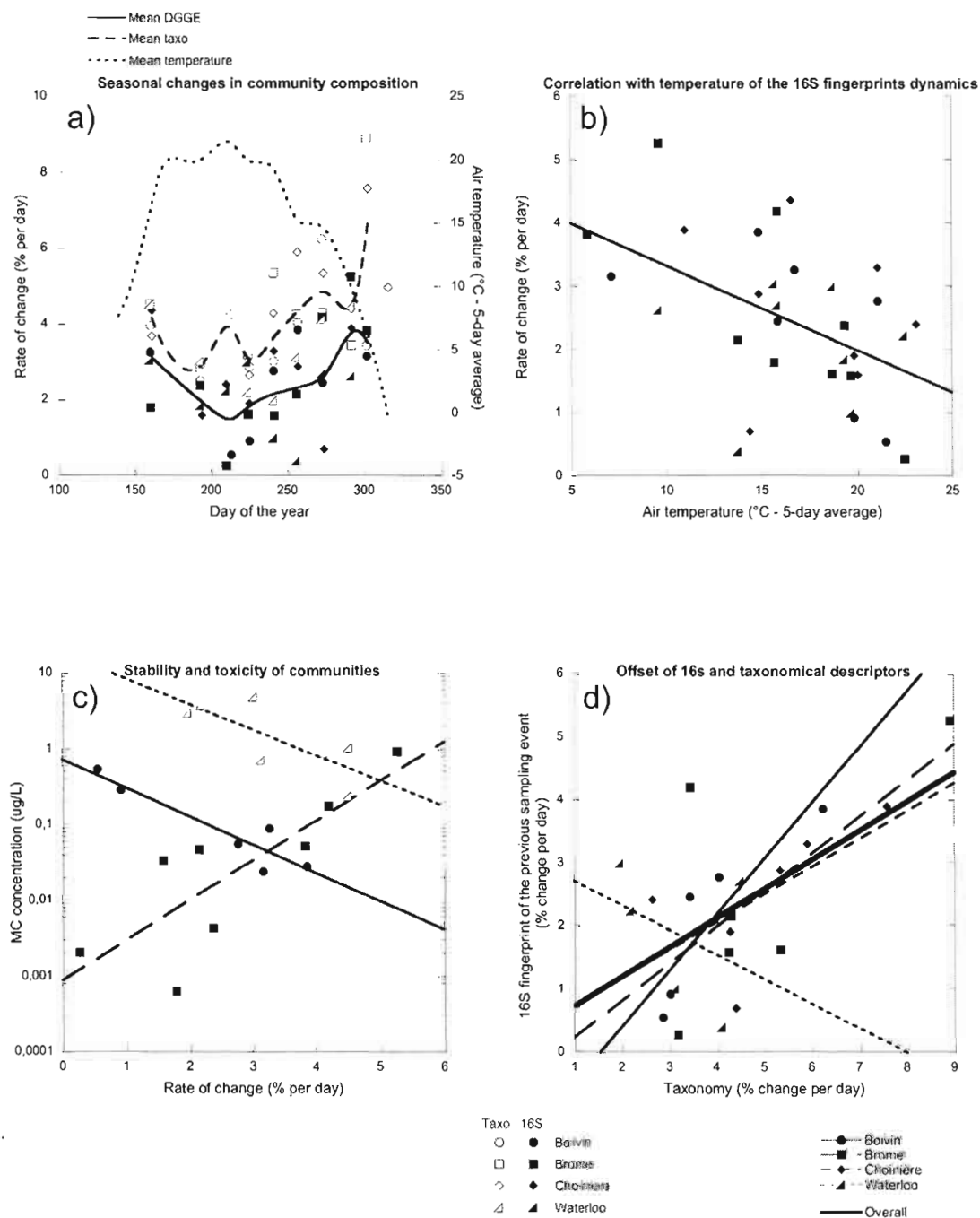


Figure 3.4 Community dynamics of the sample lakes. a) Seasonal changes in community composition. b) Correlation between 5 day average air temperature and rate of change of the 16S fingerprints. c) Correlation between rate of change and measured MC concentrations d) Offset of 16S and taxonomical rates of change.

Discussion

Toxic cyanobacteria in southern Quebec

As expected, all lakes contained detectable concentrations of microcystin during the summer of 2007. Our results were consistent with those of Giani et al. (Giani, Bird et al. 2005), who found a link between total nitrogen concentration and toxin concentration in a trophic gradient of lakes in the same region of Quebec. This study found epilimnetic MC were within an order of magnitude of the predicted values based on TN concentrations. Our lakes, which were not part of the 2005 study, are therefore comparable to others in the region in terms of trophic status and toxicity potential.

Without measuring it directly, Giani et al. were still concerned with intra-specific variations as modulators of toxin content in lakes. Having found constant biomass-specific toxin content throughout the trophic gradient, the authors concluded that the population dynamics of toxigenic species were the main driver of changes in bloom toxicity. Our study supports this finding, as MC content was similar among lakes. .

Microcystin content was highest at the beginning of the season, dropping sharply to a constant minimum until mid-October. The high initial values thus coincide with the period of rapid growth of the population. This is consistent with previous studies who suggested that MC production is related to cell growth (Orr and Jones 1998). The small, yet generalized trend of higher MC content in October could be explained by the substantial drop in cyanobacterial biomass combined with the persistence of microcystins, leading to increased MC concentrations in the water column (Lahti, Rapala et al. 1997).

Linear regressions (table 3.4) showed that microscopic enumerations at the genus level explained up to 82% of the variability of water column MC concentration. This is consistent with other reports from the literature, notably Rolland et al. who found an overall explanation of 66% for the same lakes during their 2001 study (Rolland, Bird et al. 2005). Strong collinearity between *Anabaena* and *Microcystis* biomasses in Lakes Boivin and Waterloo impaired the analysis at the generic level.

Sources of microcystins in the sampled lakes

Partitioning of the MC concentration variation between taxonomic and molecular descriptors emphasized the different sources of toxicity for each lake. This is particularly true for lake Boivin, which had a more complex succession of toxic species throughout the growing season, with dominant *Anabaena* sp. and *Microcystis aeruginosa*. In this case, where the proportion of many different species was the main driver of the MC variants composition, the DGGE method was most successful at explaining the MC variations (figure 3.3).

This same analysis applied to lake Waterloo gave a large influence to the DGGE results. However, this could be an artefact, an hypothesis supported by the associated p-value ($p = 0.0958$). Linear regressions (table 3.4) showed a remarkably weak correlation (r^2 adj. : 0.06, $p < 0.1$) of MC with *Microcystis* biomass. It is possible that the *Microcystis* strains present were non-toxic. On the other hand, there was a correlation (r^2 adj. : 0.47, $p < 0.05$) with the biomass of

Anabaena sp. Variations in the biomass of fewer species were therefore well reported by the microscopic examination.

Lake Brome had a very late *Planktothrix agardhii* bloom that coincided with the only toxic episodes of the summer. We therefore hypothesize that this species was the only major toxin producer in this lake, with the small populations of *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena solitaria* not contributing significantly to toxicity. Again, microscopic observations better represented correlations between the biomass of few species (probably just one) and MC concentrations.

Choinière Reservoir had a large (non-toxic) *Aphanizomenon flos-aquae* population, whose amplification by our primer set could have diminished the signal of other, microcystin-producing genera present. Unsurprisingly, DGGE results for this lake were not correlated with MC variants (data not shown).

In *Anabaena* and *Microcystis* dominated lakes Boivin and Waterloo, community stability was positively correlated to microcystin concentration in the water column. In contrast, this relationship had a negative slope for Lake Brome. The fast turnover of the community in favor of *Planktothrix agardhii* explains this phenomenon. As explained above, we believe that this species was the only major toxin producer in this lake in 2007. *Planktothrix agardhii* is favored over *Anabaena* sp. and *Microcystis* sp. at lower temperature (circa 16°C) (Dokulil and Teubner 2000). The maximum biomass of *Planktothrix* was attained very late in the season (days 273 and 292) when the water temperature was 18,1 °C and 13,4 °C, respectively. *Planktothrix* has the ability to grow unobserved in the thermocline, and then to rise to the surface and accumulate along the shore only during the turbulent conditions of autumnal destratification. This spread in the water column, combined with increased growth at lower temperature, produced

fall peaks in the community rate of change and water MC concentrations. In contrast, MC concentrations in lakes Waterloo and Boivin coincided, in part, with the maximum biomasses of the other MC producing genera, peaking after several weeks of relative community stability. This correlation between community stability and MC concentrations is therefore limited to certain cyanobacterial community compositions, whose definition is beyond the scope of this work.

Seasonal influence

Changes in water temperature are major drivers of phytoplankton community dynamics, at community (Johnk, Huisman et al. 2008), generic (Chu, Jin et al. 2007), specific (Imai, Chang et al. 2009) and intra-specific levels (Rapala and Sivonen 1998; Otsuka, Suda et al. 1999). In this study, the seasonal influence is clear in Lakes Boivin, Choinière and Waterloo, as illustrated by the bell shapes of the measured biomasses. Rates of change, as approximated by moving window analysis of both taxonomic and 16S fingerprint compositions, followed a pattern similar to that of air and water temperature. Change was faster at both ends of the growing season; the minima coincided with high midseason temperatures. The temperature-rate of change relationship was highly significant ($p=0.005$) among lakes, but not within lakes (except Lake Brome, $p=0.01$). A potential explanation could be the effect of different exposure levels, which can be represented by the ratio of surface area to mean depth (Magnuson, Benson et al. 2005). A greater ratio means the lake will be more subject to climatic forcing, by factors such as wind, rain and air temperature. In this respect, Lake Brome is clearly apart; its 2.44 ratio is one and a half times that of Choinière (table 3.5). At the other end of the spectrum, stable, *Anabaena-Microcystis* dominated Waterloo and Boivin have the lowest forcing.

Table 3.5 Ratio of surface area to mean depth of the study lakes ($\text{km}^2 \text{m}^{-1}$)

Boivin	0.49
Brome	2.44
Choinière	1.62
Waterloo	0.19

We found no direct correlation between water or air temperature and MC concentration, as has been reported for other Canadian lakes (Kotak, Lam et al. 1995). However, in contrast to this study, our observations were made over a single growing season, in which the range of MC concentrations was small.

Methodological considerations

Two methods were used and compared to assess these communities: light microscopy (taxonomy) and denaturing gradient gel electrophoresis of the 16S gene (DGGE). The results emphasized the better correlation of MC concentrations with larger variations in biomass (better described with taxonomy) over semi-quantitative, rare-species rich DGGE. The latter, however, showed finer changes in the community and helped identify the temperature-driven changes throughout the season.

The predictive value of DGGE (fig 3.4 d) equals to a faster response of the fingerprints to changes in the community. This can probably be attributed to the greater volume of water sampled for DGGE analysis than for microscope counting. DNA was extracted from 100 to 1000mL for the DNA analysis, vs. 5 to 20mL for the cell counting. There were always more bands (overall mean = 9,24 bands per lane) than species (overall mean = 5 cyanobacterial species), meaning that rare species were probably better represented with DGGE. The relationship between DGGE and lagged taxonomic rates of change was very noisy at lower

rates, and needs to be confirmed in a study focusing on highly variable periods of the year, like transitions between seasons. However, the very similar slopes found in three of the four lakes minimize the possibility of a statistical artefact.

Microbial ecologists encounter many problems when using DGGE fingerprints to represent natural communities, including DNA extraction bias, poor “universality” of primers and low informative value of band intensities due to their semi-quantitative nature (Forney, Zhou et al. 2004). These shortcomings have to be considered when analyzing our data. Primer specificity, in particular, is of major concern. The amplification of the *Aphanizomenon* genus is the most important issue, especially in Lake Choinière where this genus was most present (data not shown). It is impossible to tell apart *Anabaena* and *Aphanizomenon* based on their 16S sequences (Kolmonen, Sivonen et al. 2004). These additional bands could explain our failure to partition the MC variation in Lake Choinière, due to largely non-significant RDAs. Another source of noise in the molecular data is heavily amplified *Synechococcus* sp., which accounted for a number of bands in the sequenced material (data not shown). These unicellular picoplanktonic species are commonly under-represented in taxonomic analyses (Wilhelm, Bullerjahn et al. 2006).

Comparisons between taxonomic and DGGE rates of change also reveal much about how these methods describe the community. For instance, the large variations in *Anabaena* sp. and *Microcystis* sp. biomasses in Lake Waterloo were poorly depicted by the semi-quantitative nature of 16S fingerprints. The consequence was that the community stability as portrayed by this analysis was not associated with higher MC concentrations, despite the clear association using taxonomic results (Fig. 3.4c).

This study investigated the links between cyanobacterial community dynamics and toxin concentration in four southern Quebec lakes. Detectable levels of *Anabaena*, *Microcystis* and *Planktothrix* biomasses, as well as microcystin concentrations, allowed for a good correlation between these parameters both within and between lakes. We found higher MC concentration was associated with elevated community stability during the central portion of the growing season in *Anabaena-Microcystis* dominated lakes. This stability was in turn correlated to higher temperatures. Quite different results were found in *Planktothrix* dominated Lake Brome, where a very dynamic period had the highest toxin concentrations. Temperature related community stability in *Anabaena-Microcystis* dominated lakes, as well as temperature driven stratification conditions favorable to *Planktothrix* growth add up to emphasize temperature's role in determining cyanobacterial blooms. The level of exposure to climatic forcing was suggested as one of the factors responsible for differential effects of air temperature.

In recent years, accumulating evidence links large-scale oceanic fluctuations (such as the North Atlantic Oscillation) to local climate conditions, lake thermal structure and, consequently, chemical and biological conditions (Weyhenmeyer 2004). Lower trophic levels, in particular, could experience changes in species abundances, community structure and food web dynamics (Law, Zhang et al. 2009). Global shifts in the climate regime could mean longer and hotter North-American summers (IPCC 2007), which could result in a longer growth period for toxic cyanobacteria (Paerl and Huisman 2008). This study showed that the sampled lakes in the Yamaska River basin were subject to climatic forcing and that their cyanobacterial communities could potentially be affected by these large-scale climatic changes.

Supplementary material

Figure 3.5

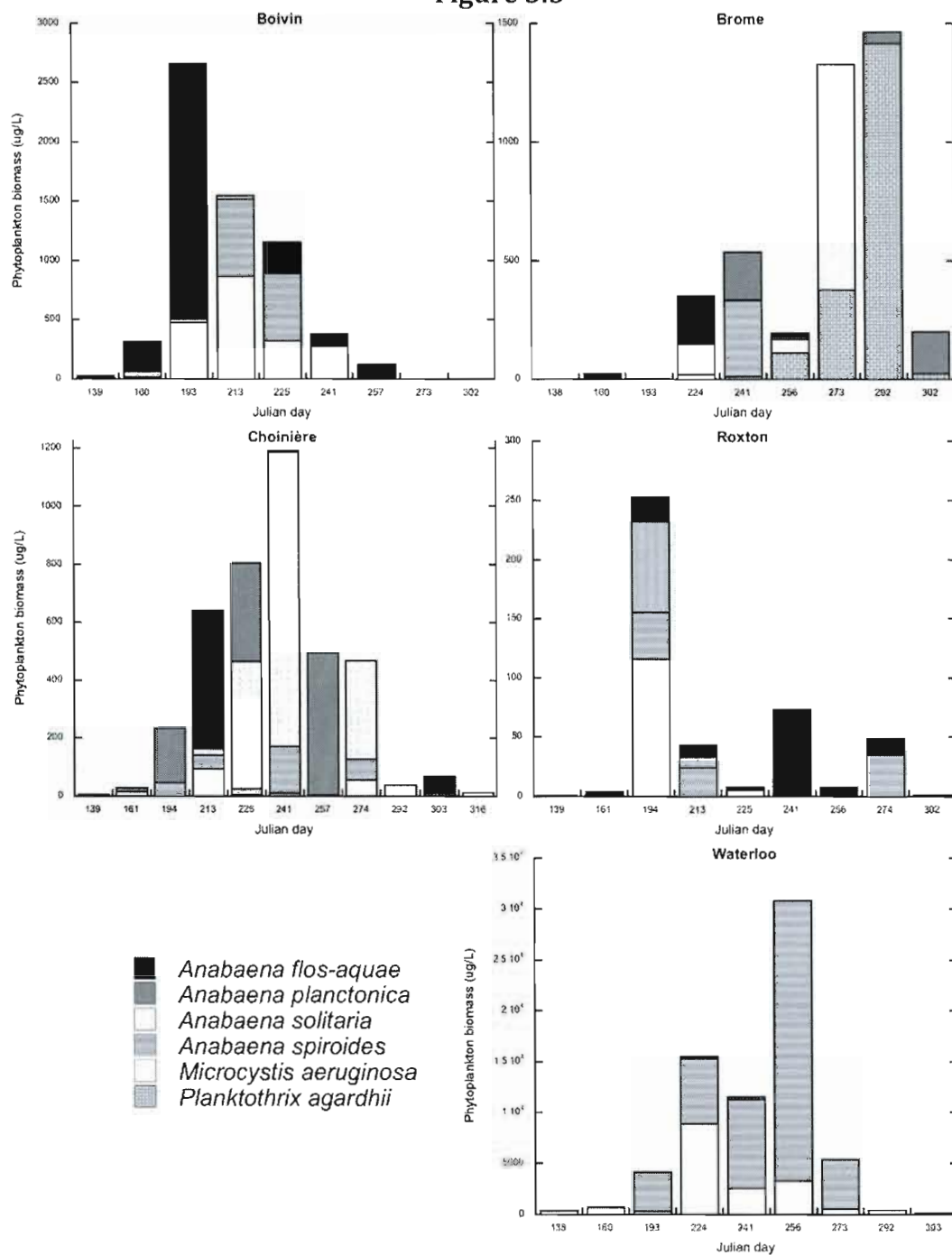


Figure 3.5 Time series of potentially toxic cyanobacterial species biomass

CHAPITRE IV

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les floraisons de cyanobactéries toxiques sont un problème à l'échelle mondiale. En effet, le développement des activités humaines entraîne un lessivage de nutriments et une érosion des sols conduisant à l'eutrophisation des lacs et des cours d'eau. Au Québec, ce problème est reconnu et de plus en plus de mécanismes sont mis en place afin d'améliorer la situation : gestion intégrée par bassin versant, révision du règlement sur les eaux usées de résidences isolées et budgets de phosphore et d'azote d'origine agricole en sont des exemples. L'accumulation de nutriments dans les sédiments des lacs, tels que ceux de la Haute-Yamaska, fait qu'une réduction des apports de nutriments peut limiter, à court terme, l'impact de ces mesures sur l'état trophique des plans d'eau. Malgré toute notre bonne volonté, ceux-ci subiront donc probablement des floraisons de cyanobactéries dans les années à venir.

Dans ce contexte, une meilleure compréhension du lien entre les communautés cyanobactériennes et leur toxicité peut avoir un impact sur la gestion des événements de floraisons. Le premier objectif de cette étude était de déterminer *in situ* si les populations de *Microcystis* des lacs de la Haute-Yamaska sont composées d'une multitude de souches. Les résultats suggèrent qu'il n'existe pas de dynamique des souches à l'intérieur des populations de *Microcystis* dans les lacs de la Haute-Yamaska. La validation de la méthode met cependant en doute cette conclusion, qui devrait être vérifiée en utilisant une amorce ciblant un gène différent. Deux études (Kardinaal et Visser, 2007 et Rinta-Kanto et al., 2009) publiées pendant la conduite du projet ont montré que des populations

naturelles de *Microcystis* sont composées de multiples souches, et l'une d'elles (Kardinaal et Visser, 2007) a réussi à établir un lien entre la dynamique de ces souches et la concentration en microcystine.

Les analyses phylogénétiques ont confirmé que les méthodes moléculaires utilisées, si elles ne sont pas spécifiques à *Microcystis*, peuvent quand même nous renseigner sur l'ensemble des genres potentiellement toxiques retrouvés dans nos lacs. Ainsi, ces données moléculaires ont pu être mises à contribution dans l'atteinte du deuxième objectif, soit d'établir un lien entre la communauté de cyanobactéries et la toxicité qui en résulte. Vu la nature semi-quantitative de la méthode DGGE, il était impossible de l'utiliser pour établir une relation linéaire avec la concentration en microcystine. Les résultats taxonomiques, par contre, ont servi à confirmer la forte corrélation ($r^2 \text{ aj.} = 0.64$) entre la biomasse de genres toxigènes et la concentration en MC. Par la suite, une méthode multivariée a servi à établir le lien entre communauté et toxicité à un niveau jamais atteint jusqu'à présent. En effet, l'utilisation d'une méthode HPLC nous a permis de détecter individuellement quatre formes de microcystine (RR,YR,LR,LW). En outre, nous avons montré que la combinaison de nos méthodes de détection (taxonomie et DGGE) des cyanobactéries peut expliquer jusqu'à 74% de la variation des formes de MC (fig 3.3). Cette analyse a aussi mis en relief les différences entre les deux méthodes.

La taxonomie classique a donné de meilleurs résultats lorsque la concentration en MC était reliée aux changements dans la biomasse d'un nombre limité d'espèces. La méthode DGGE, quant à elle, semble plus adaptée à la description de communautés complexes et fortement changeantes durant la saison de croissance. Ces méthodes sont donc complémentaires, et devraient être utilisées

ensemble dans le cadre d'une étude utilisant de meilleures amorces, notamment afin d'explorer le décalage observé dans les vitesses de changements (fig. 3.4d).

L'influence saisonnière sur les communautés de cyanobactéries toxiques a été démontrée de façon originale par l'utilisation d'un indicateur de stabilité, la vitesse de changement. Celle-ci est souvent utilisée dans les études d'écologie microbienne portant, par exemple, sur des bioréacteurs dans lesquels on veut contrôler la composition de la communauté bactérienne. Il s'agit, à notre connaissance, de la première application de cet indice pour quantifier la stabilité des communautés de cyanobactéries afin de faire le lien entre cette stabilité et la toxicité mesurée. Pour deux lacs, nous avons montré l'influence positive de la stabilité sur la concentration de microcystine. Dans un autre (le lac Brome), cette relation est inversée et nos hypothèses pour l'expliquer ont été exposées. Dans tous les lacs, la seule variable corrélée à la vitesse de changement de la communauté était la température, ce qui met en évidence l'importance du climat sur les cyanobactéries. Les saisons de transitions, soit le printemps et l'automne, pourraient être l'objet d'une étude particulière afin d'y déterminer ampleur des variations de la communautés de cyanobactéries toxiques et la concentration de toxines résultantes. Dans un contexte où les conséquences des changements climatiques à venir sont encore mal connues, une meilleure compréhension du lien entre la température et la dynamique des communautés de cyanobactéries toxiques sera essentielle à la gestion de ce problème écologique.

BIBLIOGRAPHIE

- Alonso-Saez, L., J. Aristegui, et al. (2007). "Bacterial assemblage structure and carbon metabolism along a productivity gradient in the NE Atlantic Ocean." Aquatic Microbial Ecology **46**(1): 43-53.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Research **25**(17): 3389-3402.
- Anagnostidis, K. et J. Komarek (1985). "Modern approach to the classification system of cyanophytes. 1. Introduction." Arch. Hydrobiol. Suppl. **71**(Suppl. 71): 291-302.
- Aranda-Rodriguez, R., A. Tillmanns, et al. (2005). "Pressurized liquid extraction of toxins from cyanobacterial cells." Environmental Toxicology **20**(3): 390-396.
- Babica, P., L. Blaha, et al. (2006). "Exploring the natural role of microcystins - A review of effects on photoautotrophic organisms." Journal of Phycology **42**(1): 9-20.
- Beltran, E. C. et B. A. Neilan (2000). "Geographical segregation of the neurotoxin-producing cyanobacterium *Anabaena circinalis*." Applied and Environmental Microbiology **66**(10): 4468-4474.
- Blais, S. (2002). "La problématique des cyanobactéries (algues bleu-vert) à la baie Missisquoi en 2001." Agrosol **13**(2): 103-110.
- Blomqvist, P., A. Pettersson, et al. (1994). "Ammonium-nitrogen: A key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing cyanobacteria in aquatic systems." Archiv fur Hydrobiologie **132**(2): 141-164.
- Bolch, C. J. S., S. I. Blackburn, et al. (1996). "Genetic characterization of strains of cyanobacteria using PCR-RFLP of the *cpcBA* intergenic spacer and flanking regions." Journal of Phycology **32**(3): 445-451.
- Boström, B., A.-K. Pettersson, et al. (1989). "Seasonal dynamics of a cyanobacteria-dominated microbial community in surface sediments of a shallow, eutrophic lake." Aquatic Sciences - Research Across Boundaries **51**(2): 153-178.
- Brunberg, A. K. et P. Blomqvist (2002). "Benthic overwintering of *Microcystis* colonies under different environmental conditions." Journal of Plankton Research **24**(11): 1247-1252.

- Brunberg, A. K. et P. Blomqvist (2003). "Recruitment of Microcystis (Cyanophyceae) from lake sediments: The importance of littoral inocula." Journal of Phycology **39**(1): 58-63.
- Carmichael, W. W. (1994). "The toxins of cyanobacteria." Scientific American **270**(1): 78-86.
- Christiansen, G., C. Molitor, et al. (2008). "Nontoxic Strains of Cyanobacteria Are the Result of Major Gene Deletion Events Induced by a Transposable Element." Mol Biol Evol **25**(8): 1695-1704.
- Chu, Z., X. Jin, et al. (2007). "The effect of temperature on growth characteristics and competitions of Microcystis aeruginosa and Oscillatoria mougeotii in a shallow, eutrophic lake simulator system." Hydrobiologia **581**(1): 217-223.
- Correll, D. L. (1998). "The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review." Journal of Environmental Quality **27**(2): 261-266.
- Dittmann, E., M. Erhard, et al. (2001). "Altered expression of two light-dependent genes in a microcystin-lacking mutant of Microcystis aeruginosa PCC 7806." Microbiology **147**(11): 3113-3119.
- Dittmann, E., B. A. Neilan, et al. (1997). "Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium Microcystis aeruginosa PCC 7806." Molecular Microbiology **26**(4): 779-787.
- Dokulil, M. T. et K. Teubner (2000). "Cyanobacterial dominance in lakes." Hydrobiologia **438**: 1-12.
- Dorigo, U., L. Volatier, et al. (2005). "Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities." Water Research **39**(11): 2207-2218.
- Falconer, I. R. et A. R. Humpage (1996). "Tumour promotion by cyanobacterial toxins." Phycologia **35**(SUPPL.): 74-79.
- Forney, L. J., X. Zhou, et al. (2004). "Molecular microbial ecology: Land of the one-eyed king." Current Opinion in Microbiology **7**(3): 210-220.
- Fromin, N., J. Hamelin, et al. (2002). "Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns." Environmental Microbiology **4**(11): 634-643.
- Ganf, G. G. et R. L. Oliver (1982). "Vertical Separation of Light and Available Nutrients as a Factor Causing Replacement of Green Algae by Blue-Green Algae in the Plankton of a Stratified Lake." The Journal of Ecology **70**(3): 829-844.
- Giani, A., D. F. Bird, et al. (2005). "Empirical study of cyanobacterial toxicity along a trophic gradient of lakes." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **62**(9): 2100-2109.
- Guiry, M. D. et G. M. Guiry (2009). AlgaeBase. consulté le 16 mars 2009, National University of Ireland, Galway.

- Hedges, S. B., H. Chen, et al. (2001). "A genomic timescale for the origin of eukaryotes." BMC Evolutionary Biology **1**(1): 4.
- Hisbergues, M., G. Christiansen, et al. (2003). "PCR-based identification of microcystin-producing genotypes of different cyanobacterial genera." Archives of Microbiology **180**(6): 402-410.
- Humble, A. V., G. M. Gadd, et al. (1997). "Binding of copper and zinc to three cyanobacterial microcystins quantified by differential pulse polarography." Water Research **31**(7): 1679-1686.
- Imai, H., K. H. Chang, et al. (2009). "Temperature-dependent dominance of *Microcystis* (Cyanophyceae) species: *M. aeruginosa* and *M. wesenbergii*." Journal of Plankton Research **31**(2): 171-178.
- IPCC (2007). *Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability*. Genève.
- ISO (2005). *Water quality—Determination of microcystins— Method using solid phase extraction (SPE) and high performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection*. International Organization for Standardization: 1-17.
- Jacoby, J. M., D. C. Collier, et al. (2000). "Environmental factors associated with a toxic bloom of *Microcystis aeruginosa*." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **57**(1): 231-240.
- Jahnichen, S., T. Petzoldt, et al. (2001). "Evidence for control of microcystin dynamics in Bautzen Reservoir (Germany) by cyanobacterial population growth rates and dissolved inorganic carbon." Archiv fur Hydrobiologie **150**(2): 177-196.
- Janse, I., W. E. A. Kardinaal, et al. (2004). "Toxic and nontoxic *Microcystis* colonies in natural populations can be differentiated on the basis of rRNA gene internal transcribed spacer diversity." Applied and Environmental Microbiology **70**(7): 3979-3987.
- Johnk, K. D., J. Huisman, et al. (2008). "Summer heatwaves promote blooms of harmful cyanobacteria." Global Change Biology **14**(3): 495-512.
- Kaneko, T., N. Nakajima, et al. (2008). "Complete Genomic Structure of the Bloom-forming Toxic Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843." DNA Res: dsm026.
- Kardinaal, W. E. et P. Visser (2007). "Microcystis genotype succession in relation to microcystin concentrations in freshwater lakes." Aquatic Microbial Ecology **48**: 1-12.
- Kardinaal, W. E. A., L. Tonk, et al. (2007). "Competition for Light between Toxic and Nontoxic Strains of the Harmful Cyanobacterium *Microcystis*." Appl. Environ. Microbiol. **73**(9): 2939-2946.
- Kent, A. D., A. C. Yannarell, et al. (2007). "Synchrony in aquatic microbial community dynamics." ISME J **1**(1): 38-47.

- Kolmonen, E., K. Sivonen, et al. (2004). "Diversity of cyanobacteria and heterotrophic bacteria in cyanobacterial blooms in Lake Joutikas, Finland." Aquatic Microbial Ecology **36**(3): 201-211.
- Komarek, J. (1992). Diversity and modern classification of Cyanobacteria (Cyanoprokaryota).
- Komarek, J. et K. Agnostidis (2005). Cyanoprokaryota-2. Teil/2nd Part: Oscillatoriales. Heidelberg, Elsevier Spektrum.
- Komarek, J. et J. Komarkova (2002). "Review of the European Microcystis-morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature." Czech Phycology **2**: 1-24.
- Komarek, J. et E. Zapomelova (2008). "Planktic morphospecies of the cyanobacterial genus *Anabaena* = subg. *Dolichospermum*." Fottea **8**(1): 1-14.
- Kondo, R., T. Yoshida, et al. (2000). "DNA-DNA reassociation among a bloom-forming cyanobacterial genus, *Microcystis*." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **50**(2): 767-770.
- Kotak, B. G., A. K. Y. Lam, et al. (1995). "Variability of the Hepatotoxin Microcystin-Lr in Hypereutrophic Drinking-Water Lakes." Journal of Phycology **31**(2): 248-263.
- Kromkamp, J. C. et L. R. Mur (1984). "Buoyant density changes in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* due to changes in the cellular carbohydrate content." FEMS Microbiology Letters **25**(1): 105-109.
- Kump, L. R. (2008). "The rise of atmospheric oxygen." Nature **451**(7176): 277-278.
- Kurmayer, R., G. Christiansen, et al. (2003). "The abundance of microcystin-producing genotypes correlates positively with colony size in *Microcystis* sp. and determines its microcystin net production in Lake Wannsee." Applied and Environmental Microbiology **69**(2): 787-795.
- Kurmayer, R. et T. Kutzenberger (2003). "Application of real-time PCR for quantification of microcystin genotypes in a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* sp." Applied and Environmental Microbiology **69**(11): 6723-6730.
- Lahti, K., J. Rapala, et al. (1997). "Persistence of cyanobacterial hepatotoxin, microcystin-LR in particulate material and dissolved in lake water." Water Research **31**(5): 1005-1012.
- Law, T., W. Zhang, et al. (2009). "Structural changes in lake functioning induced from nutrient loading and climate variability." Ecological Modelling **220**(7): 979-997.
- Legendre, P. et L. Legendre (1998). Numerical Ecology. Amsterdam, Elsevier.
- Magnuson, J. J., B. J. Benson, et al. (2005). Coherent dynamics among lakes. Long Term Dynamics of Lakes in the Landscape: 89-106.

- Marinho, M. et S. de Oliveira (2007). "Influence of N/P ratio on competitive abilities for nitrogen and phosphorus by *Microcystis aeruginosa* and *Aulacoseira distans*." Aquatic Ecology **41**(4): 525-533.
- Marzorati, M., L. Wittebolle, et al. (2008). "How to get more out of molecular fingerprints: Practical tools for microbial ecology." Environmental Microbiology **10**(6): 1571-1581.
- McDermott, C. M., C. W. Nho, et al. (1998). "The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types." Toxicon **36**(12): 1981-1996.
- MDDEP (2008). Les fleurs d'eau d'algues bleu-vert en 2008.
- Menden-Deuer, S. et E. J. Lessard (2000). "Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton." Limnology and Oceanography **45**(3): 569-579.
- Mikalsen, B., G. Boison, et al. (2003). "Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains." Journal of Bacteriology **185**(9): 2774-2785.
- Msagati, T. A. M., B. A. Siame, et al. (2006). "Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins." Aquatic Toxicology **78**(4): 382-397.
- Muyzer, G., E. C. De Waal, et al. (1993). "Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA." Applied and Environmental Microbiology **59**(3): 695-700.
- Neilan, B. A., D. Jacobs, et al. (1997). "rRNA Sequences and Evolutionary Relationships among Toxic and Nontoxic Cyanobacteria of the Genus *Microcystis*." Int J Syst Bacteriol **47**(3): 693-697.
- Nocker, A., M. Burr, et al. (2007). "Genotypic microbial community profiling: A critical technical review." Microbial Ecology **54**(2): 276-289.
- Oh, H. M., S. J. Lee, et al. (2000). "Microcystin production by *Microcystis aeruginosa* in a phosphorus-limited chemostat." Applied and Environmental Microbiology **66**(1): 176-179.
- Ohta, T., R. Nishiwaki, et al. (1992). "Hyperphosphorylation of cytokeratins 8 and 18 by microcystin-LR, a new liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes." Carcinogenesis **13**(12): 2443-2447.
- Olsen, G. J., D. J. Lane, et al. (1986). "Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach." Annual review of microbiology **40**: 337-365.
- Orr, P. T. et G. J. Jones (1998). "Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures." Limnology and Oceanography **43**(7): 1604-1614.
- Otsuka, S., S. Suda, et al. (2000). "Morphological variability of colonies of *Microcystis* morphospecies in culture." The Journal of General and Applied Microbiology **46**(1): 39-50.

- Otsuka, S., S. Suda, et al. (1999). "Characterization of morphospecies and strains of the genus *Microcystis* (Cyanobacteria) for a reconsideration of species classification." Phycological Research **47**(3): 189-197.
- Otsuka, S., S. Suda, et al. (2001). "A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kutzing ex Lemmermann 1907 under the rules of the bacteriological code." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **51**(3): 873-879.
- Paerl, H. W. et J. Huisman (2008). "Climate: Blooms like it hot." Science **320**(5872): 57-58.
- Palinska, K. A., W. Liesack, et al. (1996). "Phenotype variability of identical genotypes: the need for a combined approach in cyanobacterial taxonomy demonstrated on Merismopedia-like isolates." Archives of Microbiology **166**(4): 224-233.
- Pannard, A., M. Bormans, et al. (2008). "Phytoplankton species turnover controlled by physical forcing at different time scales." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **65**(1): 47-60.
- Paulino, S., E. Valério, et al. (2009). "Detection of *Planktothrix rubescens* (Cyanobacteria) associated with microcystin production in a freshwater reservoir." Hydrobiologia **621**(1): 207-211.
- Pearson, L. A. et B. A. Neilan (2008). "The molecular genetics of cyanobacterial toxicity as a basis for monitoring water quality and public health risk." Current Opinion in Biotechnology **19**(3): 281-288.
- Possemiers, S., K. Verthe, et al. (2004). "PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem." Fems Microbiology Ecology **49**(3): 495-507.
- Prescott, Harley, et al. (1995). Microbiologie. Bruxelles, De Boeck Université.
- Ramette, A. (2007). "Multivariate analyses in microbial ecology." FEMS Microbiology Ecology **62**(2): 142-160.
- Rantala, A., D. P. Fewer, et al. (2004). "Phylogenetic evidence for the early evolution of microcystin synthesis." PNAS **101**(2): 568-573.
- Rapala, J., K. Erkomaa, et al. (2002). "Detection of microcystins with protein phosphatase inhibition assay, high-performance liquid chromatography-UV detection and enzyme-linked immunosorbent assay: Comparison of methods." Analytica Chimica Acta **466**(2): 213-231.
- Rapala, J. et K. Sivonen (1998). "Assessment of environmental conditions that favor hepatotoxic and neurotoxic *Anabaena* spp. strains cultured under light limitation at different temperatures." Microbial Ecology **36**(2): 181-192.
- Rinta-Kanto, J. M., E. A. Konopko, et al. (2009). "Lake Erie *Microcystis*: Relationship between microcystin production, dynamics of genotypes and environmental parameters in a large lake." Harmful Algae.

- Roelke, D. et Y. Buyukates (2001). "The diversity of harmful algal bloom-triggering mechanisms and the complexity of bloom initiation." Human and Ecological Risk Assessment (HERA) **7**(5): 1347-1362.
- Rohrlack, T., E. Dittmann, et al. (1999). "Role of Microcystins in Poisoning and Food Ingestion Inhibition of *Daphnia galeata* Caused by the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*." Appl. Environ. Microbiol. **65**(2): 737-739.
- Rolland, A., D. F. Bird, et al. (2005). "Seasonal changes in composition of the cyanobacterial community and the occurrence of hepatotoxic blooms in the eastern townships, Quebec, Canada." Journal of Plankton Research **27**(7): 683-694.
- Rozen, S. and H. Skaletsky (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) **132**: 365-386.
- Santé Canada (2006). Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada. Comité fédéral-provincial-territorial sur l'eau potable.
- Schopf, J. W. (2006). "Fossil evidence of Archaean life." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **361**(1470): 869-885.
- Shapiro, J. (1990). "Current beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for the importance of CO₂ and pH." Verh. Int. Verein. Limnol. **24**: 38-54.
- Smith, V. H. (1986). "Light and nutrient effects on the relative biomass of blue-green algae in lake phytoplankton." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **43**(1): 148-153.
- Sommer, U. (1989). Plankton Ecology: Succession in Plankton Ecology, Springer-Verlag.
- Stal, L. J. et R. Moezelaar (1997). "Fermentation in cyanobacteria." FEMS Microbiology Reviews **21**(2): 179-211.
- Tillmanns, A. R., F. R. Pick, et al. (2007). "Sampling and analysis of microcystins: Implications for the development of standardized methods." Environmental Toxicology **22**(2): 132-143.
- Utermöhl, H. (1958). "Zur Vervollkmmnung der quantitativen Phytoplankton-Methodik." Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol. **9**: 1-38.
- Utkilen, H. et N. Gjølme (1995). "Iron-stimulated toxin production in *Microcystis aeruginosa*." Appl. Environ. Microbiol. **61**(2): 797-800.
- Vaitomaa, J., A. Rantala, et al. (2003). "Quantitative Real-Time PCR for Determination of Microcystin Synthetase E Copy Numbers for *Microcystis* and *Anabaena* in Lakes." Applied and Environmental Microbiology **69**(12): 7289-7297.
- Vareli, K., E. Briasoulis, et al. (2009). "Molecular confirmation of *Planktothrix rubescens* as the cause of intense, microcystin--Synthesizing

- cyanobacterial bloom in Lake Ziros, Greece." Harmful Algae **8**(3): 447-453.
- Verspagen, J. M. H., E. O. F. M. Snelder, et al. (2004). "Recruitment of benthic *Microcystis* (Cyanophyceae) to the water column: Internal buoyancy changes or resuspension?" Journal of Phycology **40**(2): 260-270.
- Verspagen, J. M. H., P. M. Visser, et al. (2006). "Aggregation with clay causes sedimentation of the buoyant cyanobacteria *Microcystis* spp." Aquatic Microbial Ecology **44**(2): 165-174.
- Vézic, C., J. Rapala, et al. (2002). "Effect of Nitrogen and Phosphorus on Growth of Toxic and Nontoxic *Microcystis* Strains and on Intracellular Microcystin Concentrations." Microbial Ecology **43**(4): 443-454.
- Via-Ordorika, L., J. Fastner, et al. (2004). "Distribution of microcystin-producing and non-microcystin-producing *Microcystis* sp. in European freshwater bodies: Detection of microcystins and microcystin genes in individual colonies." Systematic and Applied Microbiology **27**(5): 592-602.
- Walsby, A. E. (1969). "The Permeability of Blue-Green Algal Gas-Vacuole Membranes to Gas." Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences **173**(1031): 235-255.
- Ward, D. M., R. Weller, et al. (1990). "16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community." Nature **345**(6270): 63-65.
- Weyhenmeyer, G. A. (2004). "Synchrony in relationships between the North Atlantic Oscillation and water chemistry among Sweden's largest lakes." Limnology and Oceanography **49**(4 I): 1191-1201.
- Whitman, W. B., D. C. Coleman, et al. (1998). "Prokaryotes: The unseen majority." PNAS **95**(12): 6578-6583.
- Wilhelm, S. W., G. S. Bullerjahn, et al. (2006). "Seasonal hypoxia and the genetic diversity of prokaryote populations in the central basin hypolimnion of Lake Erie: Evidence for abundant cyanobacteria and photosynthesis." Journal of Great Lakes Research **32**(4): 657-671.
- Willame, R., C. Boutte, et al. (2006). "Morphological and molecular characterization of planktonic cyanobacteria from Belgium and Luxembourg." Journal of Phycology **42**(6): 1312-1332.
- Wilson, A. E., O. Sarnelle, et al. (2005). "Genetic variation of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* within and among lakes: Implications for harmful algal blooms." Applied and Environmental Microbiology **71**(10): 6126-6133.
- Wilson, A. E., W. A. Wilson, et al. (2006). "Intraspecific variation in growth and morphology of the bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*." Applied and Environmental Microbiology **72**(11): 7386-7389.

- World Health Organization (1999). Toxic cyanobacteria in water. Guidelines for drinking water quality. I. B. Chorus, J, E & FN Spon: 416.
- Yoshida, M., T. Yoshida, et al. (2008). "Intra-specific phenotypic and genotypic variation in toxic cyanobacterial Microcystis strains." Journal of Applied Microbiology **105**(2): 407-415.
- Yoshida, M., T. Yoshida, et al. (2007). "Dynamics of microcystin-producing and non-microcystin-producing Microcystis populations is correlated with nitrate concentration in a Japanese lake." FEMS Microbiology Letters **266**(1): 49-53.
- Yoshizawa, S., R. Matsushima, et al. (1990). "Inhibition of protein phosphatases by microcystis and nodularin associated with hepatotoxicity." Journal of Cancer Research and Clinical Oncology **116**(6): 609-614.
- Zegura, B., T. T. Lah, et al. (2004). "The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage." Toxicology **200**(1): 59-68.

ANNEXE I

Réactifs utilisés

1. Tampon de lyse pour extraction

Pour 100 mL

5 mL	Tris	1M (pH 8)
10 mL	EDTA	0,5M (pH 8)
5 mL	Sucrose	1M (stérilisé par filtration 0,2 uM)
2,5 mL	SDS	20% (stérilisé par filtration 0,2 uM)
2 mL	NaCl	5M

Compléter à 100 avec de l'eau Nanopure stérile
Filtrer 0,2 uM dans un contenant stérile

2. Tampon TE

Pour 100 mL

1 mL	Tris-HCl	1M (pH 8)
200 uL	EDTA	1mM (pH 8)

Compléter à 100 mL avec de l'eau Nanopure
Autoclaver

3. Tampon TAE 50X

Pour 500 mL

121 g	Tris	
28,6 mL	Acide acétique glacial	
50 mL	EDTA	0,5 M (ph 8)

Compléter à 500 mL avec de l'eau Nanopure
Autoclaver

4. Solutions pour DGGE

- 0% Dénaturant

Pour 100 mL

17,5 mL	acrylamide	7%
2 mL	TAE	50X

Compléter à 100 mL avec de l'eau Nanopure

- 85% Dénaturant

Pour 100 mL

17,5 mL	acrylamide	7%
2 mL	TAE	50X
34 mL	formamide	34%
36,1 g	urée	5,95 U

Compléter à 100 mL avec de l'eau Nanopure

- Solution de travail (working solution)

Les solutions à 0 et 85 % de dénaturant sont mélangées pour atteindre le % de dénaturant désiré.

Pour ~10 mL

10 mL	Solution dénaturant	% désiré
60 uL	APS	10%
60 uL	Colorant	facultatif
6,3 uL	TEMED	

ANNEXE II

Code	Lac	Espèce	Isolé le	Toxicité
Apha 2	Brome	<i>Aphanizomenon sp.</i>	30/09/07	
Mic aer 1	Brome	<i>M. aeruginosa</i>	30/09/07	
Mic wes 1	Brome	<i>M. wesenbergi</i>	30/09/07	
Mic wes 2	Brome	<i>M. wesenbergi</i>	30/09/07	
Plankto 1	Brome	<i>Planktothrix sp.</i>	30/09/07	
Plankto 14	Champlain	<i>Aphanocapsa planctonica</i>	03/07/07	
Plankto 26	Champlain	<i>M. aeruginosa</i>	03/07/07	Oui
Plankto 27	Champlain	<i>M. aeruginosa</i>	03/07/07	
Plankto 30	Champlain	<i>Gomphosphaeria sp.</i>	03/07/07	
Plankto 48	Champlain	<i>M. flos-aquae</i>	23/08/07	
Plankto 50	Champlain	<i>A. circinalis</i>	23/08/07	
Plankto 52	Champlain	<i>A. circinalis</i>	23/08/07	
Plankto 54	Champlain	<i>M. aeruginosa</i>	23/08/07	Oui
Plankto 55	Champlain	<i>Gomphosphaeria sp.</i>	23/08/07	
Plankto 58	Champlain	<i>M. aeruginosa</i>	23/08/07	
Plankto 62	Champlain	<i>Chlamydomonas sp.</i>	23/08/07	
Plankto 66	Champlain	<i>M. flos-aquae</i>	23/08/07	
Plankto 68	Champlain	<i>M. aeruginosa</i>	23/08/07	
Plankto 79	Champlain	<i>A. circinalis</i>	23/08/07	
Plankto 88	Champlain	<i>M. flos-aquae</i>	23/08/07	
Plankto 90	Champlain	<i>A. circinalis</i>	23/08/07	
Apha 5	Choiniere	<i>Aphanizomenon sp.</i>	01/10/07	
Apha 6	Choiniere	<i>Aphanizomenon sp.</i>	01/10/07	
Mic aer 1	Choiniere	<i>M. aeruginosa</i>	01/10/07	Oui

Mic aer 3	Choiniere	<i>M. aeruginosa</i>	01/10/07	Oui
Mic aer 4	Choiniere	<i>M. aeruginosa</i>	01/10/07	
Apha 1	Roxton	<i>Aphanizomenon sp.</i>	01/10/07	
Apha 3	Roxton	<i>Aphanizomenon sp.</i>	01/10/07	
Mic sp1	Selby	<i>Microcystis sp.</i>	10/10/07	
Mic wes 1	Selby	<i>M. wesenbergi</i>	01/10/08	
Ana 1	Waterloo	<i>Anabaena sp.</i>	30/09/07	
Ana 2	Waterloo	<i>Anabaena sp.</i>	30/09/07	
Mic aer 5	Waterloo	<i>M. aeruginosa</i>	30/09/07	
Pseudo 6	Waterloo	<i>Pseudoanabaena sp.</i>	30/09/07	
Syn 5	Champlain	<i>Synechocystis sp.</i>	23/08/08	
Syn 6	Champlain	<i>Synechocystis sp.</i>	23/08/08	
Syn 6/89	Champlain	<i>Synechocystis sp.</i>	23/08/08	
Syn 7	Champlain	<i>Synechocystis sp.</i>	23/08/08	
Syn 8	Champlain	<i>Synechocystis sp.</i>	23/08/08	
Syn 9	Champlain	<i>Synechocystis sp.</i>	23/08/08	
Syn 10	Champlain	<i>Synechocystis sp.</i>	23/08/08	
Syn 50	Champlain	<i>Synechocystis sp.</i>	23/08/08	